



**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

TESIS DOCTORAL

**Estudio analítico de la contaminación metálica en aguas
afectadas por actividades antropogénicas crónicas.
Métodos de control de la biodisponibilidad y toxicidad
metálica**

María José Casanueva Marengo

Cádiz, 2014

**Estudio analítico de la contaminación metálica en aguas
afectadas por actividades antropogénicas crónicas. Métodos
de control de la biodisponibilidad y toxicidad metálica**

Memoria presentada por la Licenciada en Química

María José Casanueva Marengo

para optar al grado de Doctor Europeo por la Universidad de Cádiz

Fdo.: María José Casanueva Marengo

Dirigida por las Doctoras:

**Dra. María Dolores Galindo
Riaño**

*Profesora Titular de Universidad del
Departamento de Química Analítica
de la Universidad de Cádiz*

**Dra. María Dolores Granado
Castro**

*Profesora Contratada Doctor del
Departamento de Química
Analítica de la Universidad de
Cádiz*

Puerto Real, a 22 de Abril de 2014

Dr. D. DOMINICO GUILLÉN SÁNCHEZ, PROFESOR TITULAR DE
UNIVERSIDAD Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

CERTIFICA: Que el presente trabajo ha sido realizado íntegramente en
los laboratorios de este Departamento, bajo la dirección conjunta de las
Profesoras Dra. Dña. María Dolores Galindo Riaño y Dra. Dña. María
Dolores Granado Castro.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado, en
Puerto Real a 22 de Abril de 2014.

Fdo: Dominico Guillén Sánchez

Los trabajos de investigación presentados en esta Tesis Doctoral han sido realizados gracias a la financiación recibida de la Universidad de Cádiz a través de la concesión de la Beca de Formación de Personal Investigador en el marco de su Plan Propio de Investigación, durante el periodo comprendido entre el 1 de octubre de 2007 y el 30 de septiembre de 2009, con posterior contrato, durante el periodo comprendido entre el 1 de octubre de 2009 y el 30 de septiembre de 2011 (Referencia: PU2007-011-FPI). Además, parte de la investigación de esta Tesis (Capítulo IV) se engloba dentro del Proyecto de Investigación de Excelencia del Plan Andaluz de Investigación denominado "Evaluación del efecto de la contaminación por actividades antropogénicas crónicas sobre el medio litoral" (PAI 2006: P06-FQM-02075) concedido por la Junta de Andalucía. Asimismo, durante la estancia de seis meses en la University of Ulster (Coleraine, Reino Unido) bajo la dirección del Dr. John F. Callan se realizó un estudio sobre moléculas sensoras en disolución que se encuentra detallado en el Capítulo III.

Los estudios descritos en la presente Memoria se encuentran recogidos en las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

Publicaciones

- Díaz-de Alba M., Galindo-Riaño M.D., Casanueva-Marengo M.J., García-Vargas M., Kosore C.M. "Assessment of the metal pollution, potential toxicity and speciation of sediment from Algeciras Bay (South of Spain) using chemometric tools". *Journal of Hazardous Materials* 190, 177-187 (2011).
- Casanueva-Marengo M.J., Fowley C., Hyland B.W., Hamilton G.R.C., Galindo-Riaño M.D., Callan J.F. "A new use for an old molecule: N-phenyl-2-(2-hydroxynaphthalen-1-ylmethylene)hydrazinecarbothioamide as a ratiometric 'Off-On' fluorescent probe for iron". *Tetrahedron Letters* 53, 670-673 (2012).
- Casanueva-Marengo M.J., Fowley C., Hyland B.W., Galindo-Riaño M.D., Sahoo S.K., Callan J.F. "A New Fluorescent Sensor for the Determination of Iron(III) in Semi-Aqueous Solution". *Journal of Fluorescence* 22, 795-798 (2012).
- Casanueva-Marengo M.J., Galindo-Riaño M.D., García-Vargas M., Granado-Castro M.D. "Development of a bulk liquid membrane for preconcentration and determination of lead traces from natural waters". (*En redacción*)

Congresos

- Casanueva-Marengo M.J., Galindo-Riaño M.D., García-Vargas M., Granado-Castro M.D. "A new method for preconcentration of lead traces from watery samples using a bulk liquid membrane". 2nd EuChemS Chemistry Congress, Turín (Italia), Septiembre 2008.
- Aouarram A., Casanueva-Marengo M.J., Díaz-de Alba M., El Mai H., Espada-Bellido E., Galindo-Riaño M.D., Granado-Castro M.D., Vicente-Martorell J.J. "'Aprender-diseñando' prácticas en el laboratorio de análisis". Innovación Docente en Química (INDOQUIM 2008), Cádiz (España), Junio 2008.
- El Mai H., Galindo-Riaño M.D., Díaz-de Alba M., Casanueva-Marengo M.J., García-Vargas M., Stitou M., El Yousfi F., Espada-Bellido E. "Analytical applications of organic reagents in different preconcentration and separation techniques for water analysis". 3rd Moroccan-Spanish Symposium on Organic Chemistry and 6th Andalusian-Moroccan Meeting On Natural Products Chemistry, Tetuán (Marruecos), Mayo 2009.
- Pérez-Cordovés A.I., Galindo-Riaño M.D., Casanueva-Marengo M.J., Díaz-de Alba M., El Mai H., Domínguez-Lledó F., García-Vargas M. "Metodología y validación del análisis y la especiación de metales pesados en muestras de sedimentos acuáticos". VII Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química, La Habana (Cuba), Octubre 2009.
- Díaz-de Alba M., Galindo-Riaño M.D., Vicente-Martorell J.J., Casanueva-Marengo M.J., García-Vargas M., Taye Assefa A. "Assessment of bioaccumulation and bioavailability of Ni and Cr in fish species from Algeciras Bay (Spain)". SETAC Europe Annual Meeting, Science and Technology for Environmental Protection, Sevilla (España), Mayo 2010.
- Mitto Kosore C., Galindo-Riaño M.D., Casanueva-Marengo M.J., García-Vargas M., Díaz-de Alba M. "Assessment of the metal pollution, potential toxicity and speciation of sediment from Algeciras Bay (South of Spain) using chemometric tools". VII Colloquium Chemiometricum Mediterraneum, Granada (España), Junio 2010.
- Casanueva-Marengo M.J., Callan J.F., Galindo-Riaño M.D. "Development of a new fluorescence sensor for the determination of iron(III) in aqueous solution". All-Ireland Schools of Pharmacy Research Conference 2011, Dublín (Irlanda), Abril 2011.
- Casanueva-Marengo M.J., Fowley C., Galindo-Riaño M.D., Callan J.F. "Two thiosemicarbazones as fluorescent sensors for Fe(III) determination in aqueous solutions". XIII Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA), Málaga (España), Junio 2012.

Sólo el que ha pasado por aquí es capaz de entender a la perfección todo el esfuerzo y dedicación que conlleva una Tesis. Se veía muy lejano el momento de escribir esta página, en la cual intentaré transmitir mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de algún modo u otro han formado parte de esta larga etapa. No me será fácil nombrar a todos los que han estado ahí, pues indudablemente me olvidaría de algunos nombres. No obstante, espero que todos se sientan identificados en estas líneas.

Me gustaría agradecer a mis directoras de Tesis, Dra. Dña. María Dolores Galindo Riaño y Dra. Dña. María Dolores Granado Castro, por su sabiduría, constancia, gran dedicación, paciencia y por estar siempre dispuestas a ayudarme y a guiarme en este camino de la investigación, siempre con sus sabios consejos y actitud positiva. Pero sobre todo, por permitirme conocer a dos maravillosas personas con las que ha sido un placer coincidir.

Quiero dedicar un agradecimiento muy especial al Profesor Dr. D. Manuel García Vargas, por confiar en mí desde un principio y su gran dedicación y apoyo durante años al grupo de investigación de Geoquímica Marina.

Una de las grandes experiencias que me ha permitido esta Tesis fue la de poder realizar una estancia en la University of Ulster (Coleraine, Reino Unido) bajo la dirección del Dr. John F. Callan, con el cual tuve la oportunidad de trabajar, aprender y conocer el campo de la investigación desde un punto de vista internacional.

Sin duda alguna, mis compañeros de laboratorio le han dado un toque de color a todo este camino. Con ellos he pasado muy buenos momentos (dentro y fuera del laboratorio), y han estado ahí para animar esos días que las cosas parecen torcerse y nadie mejor que ellos puede comprenderte. Entre todos los que me han acompañado, tengo que destacar a Clara, Estrella, Abdellah, Juanjo, Hafida, Bahija, Eva y, sobre todo, a Marga quien ha estado conmigo desde el inicio de la carrera. Juntas hemos pasado muchas anécdotas y momentos inolvidables y siempre ha estado ahí dispuesta a escuchar y ayudar. Tampoco me olvido de todos los compañeros que forman parte del Departamento de Química Analítica y del grupo del CASEM. Aprovecho para dar las gracias a Beni que, aún cuando más ocupado se encontraba, siempre ha conseguido sacar hueco para mis muestras e interesarse por mi trabajo. Por último, no puedo olvidarme de José Luis Insúa, gran trabajador y compañero con el que da gusto poder contar.

A mis amigos, que siempre han tenido palabras de ánimo y tiempo cuando he necesitado algún respirillo.

Aunque prefiera un segundo plano, tengo que dedicar estas líneas a un reciente Doctor, que con su actitud y energía me ha impulsado día a día para llegar hasta aquí y me hace ver las cosas desde otro prisma. Gracias David por escucharme siempre y ser como eres.

Y por último, a mis padres y hermano, a los cuales debo todo lo que soy. Por su apoyo, paciencia, cariño, comprensión, por respetar mi tiempo y espacio en esta última etapa de escritura y, en general, estar siempre a mi lado. No puedo olvidarme de mi abuela, a quien le habría encantado presenciar este día y que seguro sigue mis pasos allá donde esté.

Índice

Objetivos	1
<i>Capítulo I. Introducción general. Ecosistemas acuáticos: Contaminación por metales traza</i>	5
I.1. El agua	7
I.1.1. Distribución del agua en la Tierra	7
I.1.2. Principales propiedades del agua	9
I.1.3. Composición natural del agua	11
I.2. Contaminación de las aguas	14
I.2.1. Principales fuentes de vertidos en el medio acuático	15
I.2.2. Contaminantes en ecosistemas acuáticos	20
I.3. Contaminación acuática por metales pesados	23
I.3.1. Metales pesados: definición y principales características	23
I.3.2. Los metales pesados en los organismos vivos y su toxicidad	25
I.3.3. Origen o fuentes de metales pesados en el medio acuático	30
I.3.4. Episodios destacados de contaminación por metales pesados	34
I.3.5. Distribución de los metales pesados en los ecosistemas acuáticos	39
I.3.5.1. Procesos de disminución de la concentración de metales pesados en el medio acuático.....	42
I.3.5.2. Los sedimentos como principales sumideros de metales pesados	44

I.3.5.3. Removilización y redistribución de metales pesados desde sedimentos	47
I.3.6. Biodisponibilidad y toxicidad de metales pesados en ecosistemas acuáticos: introducción a la especiación química	51
I.4. Métodos de análisis en especiación metálica	57
I.4.1. Métodos directos empleados en especiación metálica	58
I.4.2. Métodos de especiación acoplados, combinados o híbridos	62
I.4.3. Métodos de especiación basados en modelos matemáticos	66
I.5. Especiación metálica en compartimentos naturales acuáticos: aguas y sedimentos	68
I.5.1. Especiación en aguas naturales	68
I.5.2. Especiación en sedimentos	72
I.6. Legislación ambiental	79

Capítulo II. Desarrollo de una membrana líquida de volumen para el análisis

<u>de plomo en agua de mar</u>	89
<i>Resumen</i>	91
<i>Capítulo II.A. Introducción</i>	93
II.A.1. Las membranas líquidas: procesos de extracción y reextracción	95
II.A.1.1. Extracción líquido-líquido	95
II.A.1.2. Reextracción	100
II.A.2. Sistemas de membranas líquidas	101
II.A.2.1. Introducción a las membranas líquidas	101
II.A.2.2. Tipos de membranas líquidas	102
II.A.2.3. Tipos de mecanismos de transporte en membranas líquidas	107
II.A.2.4. Agentes extractantes: transporte asistido	109
II.A.2.4.1. Compuestos del tipo <i>imino</i> como agentes transportadores	112

II.A.2.4.1.1. Principales características de las tiosemicarbazonas y su empleo como agentes quelatantes	114
II.A.2.5. Variables que determinan el proceso de transporte en membranas	118
II.A.2.6. Eficacia en el proceso de transporte en membranas líquidas	119
II.A.2.7. Aplicación de las membranas líquidas en la separación y/o preconcentración de trazas metálicas en aguas naturales	120
II.A.3. El plomo en el medio ambiente	129
II.A.3.1. El plomo en los ecosistemas acuáticos	131
II.A.4. Métodos de determinación de plomo en aguas naturales	133
II.A.4.1. Determinación de plomo en aguas con etapa previa de preconcentración	133
II.A.4.1.1. Determinación de plomo en aguas tras preconcentración mediante extracción líquido-líquido	133
II.A.4.1.2. Determinación de plomo en aguas tras preconcentración mediante extracción sólido-líquido	134
II.A.4.1.3. Determinación de plomo en aguas tras preconcentración mediante intercambio iónico	135
II.A.4.2. Determinación de plomo en aguas por Voltamperometría de Redisolución	136
<i>Capítulo II.B. Parte experimental</i>	139
II.B.1. Configuración de la membrana líquida de volumen empleada para la preconcentración de plomo	141
II.B.2. Selección del agente transportador y naturaleza de la membrana líquida.....	143
II.B.2.1. Síntesis de la tiosemicarbazona 2-hidroxibenzaldehído-N-etiltiosemicarbazona (2-HBET)	151
II.B.2.2. Estabilidad de la tiosemicarbazona 2-HBET en tolueno	153

II.B.3. Optimización del sistema de preconcentración de Pb(II) mediante la membrana líquida propuesta	154
II.B.3.1. Influencia de la naturaleza y el valor de pH de la disolución reguladora de la fase cargada sobre la eficacia del proceso de transporte	155
II.B.3.2. Influencia de la concentración de reactivo en la membrana líquida sobre la eficacia del proceso de transporte	159
II.B.3.3. Influencia de la concentración de ácido nítrico de la fase receptora sobre la eficacia del proceso de transporte.....	162
II.B.3.4. Influencia del tiempo de preconcentración sobre la eficacia del proceso de transporte	163
II.B.3.5. Influencia de la temperatura en el proceso de transporte	166
II.B.4. Influencia del ión cloruro y de la salinidad de la muestra en el proceso de transporte de Pb(II)	167
II.B.5. Procedimiento propuesto para la preconcentración del plomo en medio acuoso mediante la membrana líquida conteniendo 2-HBET	173
II.B.6. Características analíticas del método de preconcentración mediante la membrana líquida diseñada conteniendo 2-HBET	174
II.B.6.1. Repetibilidad del método de preconcentración	174
II.B.6.2. Sensibilidad del método: Límites de detección y cuantificación	176
II.B.6.3. Intervalo de linealidad del método de preconcentración de Pb(II) mediante la membrana líquida propuesta	177
II.B.7. Estudio de interferencias en el método de preconcentración con membrana líquida	180
II.B.7.1. Estudio de interferencias salinas	180
II.B.7.2. Estudio de interferencias metálicas	182
II.B.8. Aplicación del método a muestras reales de agua de mar	184
II.B.9. Conclusiones	186

<i>Capítulo III. Estudio de dos bases de Schiff como quimiosensores moleculares para la determinación selectiva de hierro en disolución</i>	187
<i>Resumen</i>	189
<i>Capítulo III.A. Introducción</i>	191
III.A.1. Introducción a los sensores químicos	193
III.A.1.1. Definición de sensor químico	194
III.A.2. Especies fluorescentes sensoras	195
III.A.2.1. Mecanismos fotoluminiscentes	199
III.A.3. Aplicaciones de los métodos de fluorescencia molecular	205
III.A.3.1. Ventajas e inconvenientes de los métodos de detección por fluorescencia	207
III.A.3.2. Aplicación de fluoróforos en la determinación de iones metálicos	208
III.A.3.3. Quimiosensores moleculares aplicados a la determinación de hierro en disolución.....	214
<i>Capítulo III.B. Parte experimental</i>	217
III.B.1. Bases de Schiff como ligandos fluorogénicos en el desarrollo de sensores químicos para la determinación de Fe	219
III.B.2. Sensor a: 2-hidrox-naftaldehído-N-feniltiosemicarbazona (2-HNFT)	220
III.B.2.1. Síntesis y caracterización química	220
III.B.2.2. Características espectrales del reactivo 2-HNFT en disolución	224
III.B.2.3. Efecto del pH en la fluorescencia de la disolución de sensor 2-HNFT	225
III.B.2.4. Estudio del ligando 2-HNFT como molécula sensora para la determinación de cationes metálicos en disolución	227
III.B.2.5. Determinación de la estequiometría del complejo 2-HNFT-Fe(III)	230
III.B.2.6. Rango de aplicabilidad del sensor 2-HNFT para la determinación de Fe (III) en disolución acuosa	231

III.B.2.7. Selectividad del sensor 2-HNFT	234
III.B.3. Sensor b: 2,6-bis(N-(2-hidrox-1-naftilmetilen)-diamino)-piridina (2,6-HNDP)	235
III.B.3.1. Síntesis y caracterización química	235
III.B.3.2. Características espectrales del reactivo 2,6-HNDP en disolución.....	238
III.B.3.3. Efecto del pH en la fluorescencia de la disolución de sensor 2,6-HNDP	239
III.B.3.4. Estudio del ligando 2,6-HNDP como molécula sensora para la determinación de cationes metálicos en disolución	241
III.B.3.5. Determinación de la estequiometría del complejo 2,6-HNDP-Fe(III)	244
III.B.3.6. Rango de aplicabilidad del sensor 2,6-HNDP para la determinación de Fe (III) en disolución acuosa	246
III.B.3.7. Selectividad del sensor 2,6-HNDP.....	249
III.B.4. Conclusiones	252
 <i>Capítulo IV. Evaluación de la contaminación metálica en la Bahía de Algeciras</i>	255
<i>Resumen</i>	257
<i>Capítulo IV.A. Introducción</i>	259
IV.A.1. Descripción de la zona de estudio: Bahía de Algeciras	261
IV.A.1.1. Situación geográfica	261
IV.A.1.2. Aspectos climatológicos de la zona	264
IV.A.1.3. Preocupación medioambiental de la Bahía de Algeciras	264
IV.A.1.3.1. Contaminación asociada a actividades marítimas	265
IV.A.1.3.2. Contaminación asociada a zonas industriales de la Bahía de Algeciras	267
IV.A.2. Estudios de impacto ambiental realizados en la Bahía de Algeciras en los últimos años	274
IV.A.3. Metales estudiados en la Bahía de Algeciras	279

IV.A.3.1. Cinc	279
IV.A.3.2. Cadmio	282
IV.A.3.3. Plomo	284
IV.A.3.4. Cobre	285
IV.A.4. Naturaleza de las muestras	287
IV.A.4.1. Aguas	287
IV.A.4.2. Sedimentos	289
IV.A.4.3. Muestras biológicas	292
<i>Capítulo IV.B. Parte experimental</i>	297
IV.B.1. Toma de muestra	299
IV.B.1.1. Muestras de agua	299
IV.B.1.2. Muestras de sedimento	301
IV.B.1.3. Muestras biológicas: peces	302
IV.B.2. Metodología	303
IV.B.2.1. Parámetros físico-químicos en aguas	303
IV.B.2.2. Contenido total y especiación de Zn, Cd, Pb y Cu en agua de mar	305
IV.B.2.2.1. Análisis de blancos, límites de detección y validación de la técnica DPASV para la determinación de trazas de Zn, Cd, Pb y Cu en aguas	310
IV.B.2.3. Contenido total y especiación de Zn, Cd, Pb y Cu en sedimentos	313
IV.B.2.3.1. Estudio del contenido metálico total en sedimentos	314
IV.B.2.3.1.1. Análisis de blancos, límites de detección y validación de la metodología empleada para los análisis del contenido metálico total en sedimentos	315
IV.B.2.3.2. Estudio de especiación metálica en sedimentos	316

IV.B.2.3.2.1. Análisis de blancos, límites de detección y validación de la metodología empleada para los análisis de especiación en sedimentos	320
IV.B.2.4. Contenido metálico de Zn, Cd, Pb y Cu en muestras biológicas	321
IV.B.2.4.1. Análisis de blancos, límites de detección y validación de la metodología empleada para los análisis del contenido metálico total en muestras biológicas	323
IV.B.2.5. Tratamiento estadístico de los datos.....	325
IV.B.3. Selección de los puntos de muestreo	326
IV.B.4. Estudio de los parámetros físico-químicos en la Bahía de Algeciras	330
IV.B.4.1. Parámetros físico-químicos medidos <i>in situ</i> en la Bahía de Algeciras	331
IV.B.4.2. Parámetros físico-químicos medidos en el laboratorio	339
IV.B.5. Distribución y disponibilidad de Zn, Cd, Pb y Cu en la Bahía de Algeciras	347
IV.B.5.1. Contenido metálico en aguas marinas	347
IV.B.5.1.1. Contenido metálico total en aguas	347
IV.B.5.1.2. Especiación metálica en las aguas: distribución entre fase disuelta y particulada	352
IV.B.5.2. Contenido metálico en sedimentos marinos	359
IV.B.5.2.1. Contenido metálico total en sedimentos	360
IV.B.5.2.2. Especiación metálica en sedimentos	366
IV.B.5.3. Contenido metálico en muestras biológicas	375
IV.B.6. Comparación del contenido metálico	384
IV.B.6.1. Comparación de la contaminación entre los puntos de muestreo seleccionados	385
IV.B.6.2. Comparación de las concentraciones metálicas encontradas en la Bahía de Algeciras con valores de referencia.....	401

IV.B.6.2.1. Comparación de resultados en muestras de agua con valores de referencia	401
IV.B.6.2.2. Comparación de resultados en muestras de sedimento con valores de referencia	406
IV.B.6.2.3. Comparación de resultados en muestras de peces con valores de referencia	414
IV.B.7. Conclusiones	418
<i>Conclusiones generales</i>	421
<i>Anexos</i>	423
<i>Referencias</i>	459
<i>English Summary</i>	525
<i>Artículos derivados de la Tesis</i>	625

Objetivos

La capacidad de algunos metales pesados de producir el fenómeno de biomagnificación o bioacumulación, junto a la toxicidad que han mostrado ocasionar en la salud humana, los convierten en sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas en la que se incluyen de forma explícita estos elementos, así como algunos de sus compuestos (Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, publicada en el DOUE núm. L348/84, de 24 de diciembre de 2008).

Las actividades humanas, tanto industriales como urbanas, han ocasionado a lo largo de la historia la contaminación de las aguas de los ríos, estuarios y costas como resultado de los vertidos de sustancias diversas, entre las que destacan los metales pesados. Estos elementos tienen tendencia a concentrarse en la mayoría de los compartimentos acuáticos que conforman un determinado ecosistema (entre los que destacan la materia suspendida, los sedimentos y los organismos), pudiendo pasar a formar parte de la cadena alimentaria y, por consiguiente, son considerados potenciales contaminantes para la salud humana.

Dada la enorme preocupación por conseguir y mantener el buen estado de los ecosistemas acuáticos, surgió la Directiva 2000/60/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario en el ámbito de la política de aguas, conocida popularmente como Directiva Marco del Agua (DMA), la cual regula los usos y protección de las aguas a nivel europeo, así como establece los parámetros y métricos necesarios para realizar la medición de la calidad de las aguas, con el objetivo de mantener la buena calidad de éstas.

Una de las líneas de investigación principales del grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral (Geoquímica Marina, RNM-236 de la Junta de Andalucía) es el desarrollo de nuevas metodologías para la determinación de metales pesados en muestras medioambientales. Así, los principales objetivos

perseguidos en estos trabajos de investigación han sido abordados desde dos puntos de vista: el desarrollo de nuevos métodos de análisis químico que sean fiables para evaluar los niveles subtrazas y ultratrazas de metales pesados y la aplicación de éstas y otras metodologías al estudio de la contaminación metálica de origen antropogénico en aguas costeras andaluzas, así como la evaluación de las formas químicas más biodisponibles, que pueden ser relacionadas con la toxicidad ambiental.

Así, los estudios descritos en la presente memoria de investigación, se encuentran distribuidos de la siguiente forma:

- En primer lugar se presenta el *Capítulo I*, el cual consta de una introducción general acerca los metales pesados en los ecosistemas acuáticos.

En los dos siguientes capítulos se han aplicado ligandos orgánicos con altas propiedades quelatantes, caracterizados por la presencia del grupo imino, en la determinación de trazas metálicas en muestras acuosas.

- En el *Capítulo II* se desarrolla un nuevo método para la preconcentración y análisis de tazas de plomo basado en el empleo de una membrana líquida de volumen, mediante el uso del ligando orgánico 2-hidroxibenzaldehído N-etiltiosemicarbazona (2-HBET) como agente transportador en la membrana. Cabe destacar la aplicación de este método a muestras naturales, especialmente muestras salinas.

- El *Capítulo III*, el cual fue llevado a cabo durante una estancia de investigación en la University of Ulster (Coleraine, UK) bajo la dirección del Profesor D. John Callan, donde se estudiaron dos bases de Schiff como moléculas sensoras fluorescentes para hierro, proponiéndose dichas moléculas como potenciales indicadores para futuros estudios en el campo de los sensores ópticos.

- Por último, en el *Capítulo IV* se muestra el estudio sobre la influencia global de la actividad antropogénica en un medio costero singular caracterizado por un impacto crónico persistente y de gran interés como es la Bahía de Algeciras, donde:

- Se establecen los niveles de concentración metálica total de Zn, Cd, Pb y Cu, presentes en las aguas y sedimentos tomados de la zona, donde además se evalúa su distribución en función de las distintas fracciones químicas (estudios de especiación) en ambas muestras medioambientales.
- Se analizan y cuantifican los niveles de concentración metálica total de estos metales en tejidos biológicos de branquias, hígado y músculo en peces de interés comercial. Así se evalúa el nivel de contaminación química por metales

pesados que presentan estas especies biomonitoras de contaminantes inorgánicos.

- Se estudia la correlación de los niveles metálicos en el medio biótico con el medio abiótico, identificando las formas químicas más biodisponibles y, en consecuencia con mayor potencial tóxico.

Capítulo I.

Introducción general.

Ecosistemas acuáticos: Contaminación por metales traza

I.1. El agua

"Creemos conocer el agua. La ingerimos con casi todo aquello que bebemos o comemos. Nos lavamos con ella, nadamos y flotamos en ella. Unas veces deseamos que deje de caer; otras, que caiga cuanto antes. Sabemos que hay que beber varios litros diarios de agua, en función del calor y la sudoración pues, en caso contrario, la sed nos apremia primero y luego nos tortura. Sabemos que todo aquello que sale de nuestro cuerpo contiene agua: la sangre, el aliento, el sudor, el aire que exhalamos, las lágrimas o la saliva. Sabemos que hay que regar las plantas si no lo hace la lluvia. Sabemos que las cosas lozanas y húmedas suelen estar vivas, que las cosas marchitas y secas suelen estar muertas, o esperando que el agua las reviva. Sabemos que en los ríos habitan peces y otros organismos, y en sus alrededores, una gran variedad de flora y fauna. Sabemos que el océano es extenso y poderoso y que en él hay ballenas y tiburones. Sabemos que el agua está cargada de simbolismo, empleándola en numerosos rituales,..." [Caldecott, 2011].

Desde este punto de vista, la percepción que se tiene del agua supone una pequeña parte de la realidad total de la misma. Es por ello, que la inquietud del hombre ha provocado que sea un recurso de gran interés y ampliamente estudiado en muchos ámbitos.

I.1.1. Distribución del agua en la Tierra

Como es bien conocido, el agua es esencial para la vida y es uno de los principales constituyentes que definen a nuestro planeta, también conocido como "el planeta azul". El agua cubre 3/4 partes (75%) de la superficie de la Tierra, pudiendo encontrarse en cualquiera de sus tres estados: sólido, líquido o gas.

Se estima que en la Tierra hay un total de aproximadamente 1.335.000.000 km³ de agua, donde el 96,3% de este volumen se encuentra en los océanos (Figura I.1). Más de la mitad del agua restante se encuentra encerrada como glaciares o capas de hielo. La mayoría del resto del agua se encuentra bajo la superficie, en acuíferos subterráneos, los cuales constituyen inmensos reservorios donde el agua es salada o de difícil acceso. El agua superficial constituye únicamente el 0,02% del total, la cual se encuentra distribuida en forma de lagos (67,5% del total de agua superficial), agua contenida en suelos (12,2%), humedales (8,5%), agua atmosférica (9,4%), ríos (1,6%) y biosfera (0,8%) [Marshall, 2013].

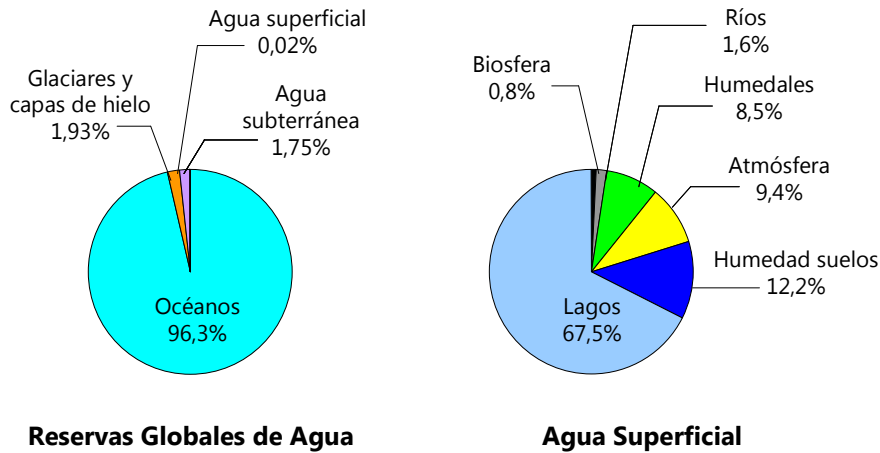


Figura I.1. Representación gráfica de la distribución del agua terrestre (figura tomada de Marshall, 2013)

El agua se encuentra en continuo flujo e intercambio entre los distintos reservorios (océanos, atmósfera, superficie terrestre, suelos, sistemas subterráneos, etc.), mediante distintos procesos físicos, químicos o biológicos englobados dentro del conocido *Ciclo Hidrológico* o *Ciclo del Agua*, gracias al cual la provisión de agua en nuestro planeta es invariante desde hace miles de años. Los principales procesos implicados en este ciclo son [Henshaw y col., 2000]:

- Precipitación, originada por la condensación de vapor de agua, en forma de lluvia, nieve o granizo.
- Fenómenos de evaporación de los océanos y otras masas de agua, y procesos de transpiración de los seres vivos (animales y plantas) hacia la atmósfera.
- Escorrentía, la cual se subdivide ampliamente en escorrentía de aguas subterráneas y de aguas superficiales.

En el *ciclo hidrológico* (Figura I.2), la energía del sol calienta la Tierra, lo cual hace que el agua se evapore mayoritariamente desde la superficie libre de los océanos y mares, ascienda por el aire y se condense en altas altitudes, para luego caer en forma de lluvia, nieve o granizo. Otros factores que intervienen en el ciclo son la evaporación de agua desde el propio terreno, la evaporación-transpiración de plantas y seres vivos, el flujo de agua de unos compartimentos a otros en forma de escorrentía, e incluso, el balance entre la detracción y el aporte de aguas usadas por el hombre [Marín-Galván, 2003].

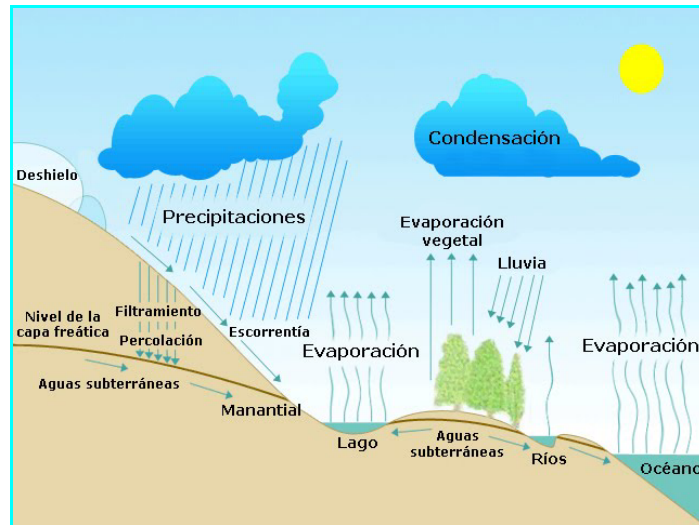


Figura I.2. Esquema de los principales procesos implicados en el ciclo hidrológico o ciclo del agua

Las reservas hídricas se encuentran, en su mayoría, destinadas a satisfacer un amplio rango de necesidades agrícolas, municipales, industriales, hidroeléctricas y ecológicas. Numerosas aplicaciones poseen carácter consuntivo, mientras que otras devuelven el agua al medio en condiciones de calidad y temporalidad similares a las iniciales. No obstante, a menudo el agua requiere de algún tratamiento para ser restaurada hasta su estado natural (aunque no siempre es posible).

La gestión integrada de los recursos hídricos es uno de los grandes retos del ser humano, ya que los recursos son limitados. Además, aspectos como desigualdades en cuanto a la abundancia y abastecimiento de agua entre regiones, crecientes demandas de agua, agotamiento de acuíferos, cambio climático y contaminación, han promovido que sea un área que requiere innovación, progreso y cooperación internacional en el presente y futuro [Marshall, 2013].

I.1.2. Principales propiedades del agua

El agua ha ejercido un papel fundamental en la evolución del planeta debido a sus peculiares propiedades, ya que ha formado parte de éste desde sus orígenes. El agua posee determinadas propiedades físicas y químicas que hacen que ésta sea considerada una sustancia única en muchos aspectos. Algunas de sus características

físico-químicas a destacar desde un punto de vista medioambiental, son las siguientes [Dodds, 2002; Orozco-Barrenetxea, 2008; Roldán y Ramírez, 2008]:

- El agua es única en cuanto a que es la única sustancia natural que se encuentra en sus *tres estados físicos* –sólido, líquido y gaseoso– a temperaturas normales o ambientales.
- Es conocida como el "*disolvente universal*" ya que puede disolver un mayor número de sustancias que cualquier otro líquido. Ello implica que por donde circule, ya sea a través del suelo, de la atmósfera, o de los seres vivos, arrastra consigo sustancias químicas, minerales y nutrientes.
- El agua posee un *alto calor específico*, es decir, absorbe una gran cantidad de calor a medida que aumenta su temperatura. Esto explica su valor y aplicación en la industria y en algunos dispositivos como líquido refrigerante. Este alto calor específico ayuda también a regular la velocidad a la cual cambia la temperatura del aire, por lo que el cambio de temperatura entre estaciones tiene lugar de forma gradual y no súbita, especialmente cerca de los océanos.
- Sus *temperaturas de fusión y ebullición*, en comparación con las de otros compuestos homólogos (H_2S , H_2Se , H_2Te), son más altas debido a la existencia de enlaces de hidrógeno intermoleculares. De no ser así, el agua fundiría entre -100 y -150°C y herviría en un rango entre -70 y -80°C, con lo cual se encontraría en estado gaseoso a temperatura ambiente y no existiría la vida tal y como se conoce.
- Su anomalía con respecto a la *densidad* del agua en estado sólido, la cual es menor que la del estado líquido, provoca que en determinados ecosistemas acuáticos el hielo flote sobre la superficie de las aguas. Esta capa sólida actúa de aislante natural contra el exterior y evita la congelación de la mayor parte de la masa de agua inferior. Esta propiedad supone una gran ventaja para la vida acuática y la supervivencia de muchas especies, además de ser ventajoso para determinadas actividades humanas.
- La naturaleza de las fuerzas de cohesión entre las moléculas en el agua líquida da lugar a una *elevada tensión superficial*, que confiere a la superficie del agua una gran resistencia frente a determinadas fuentes externas. Este hecho permite, por ejemplo, que algunos insectos de bajo peso puedan desplazarse sobre la superficie del agua.

- Debido a la alta tensión superficial que posee el agua, ésta es muy adherente y elástica, y tiende a agruparse en gotas en lugar de dispersarse en una fina capa como es el caso del alcohol isopropílico. Por tanto, la tensión superficial es la responsable de la *capilaridad*, que permite que el agua –junto con las sustancias disueltas– se mueva a través de las raíces de las plantas o por los pequeños vasos sanguíneos del cuerpo humano.

1.1.3. Composición natural del agua

Existen dos factores físicos que son de particular importancia en la composición de las aguas naturales [Bricker y Jones, 1995]:

- El tiempo de residencia: cuanto mayor sea el tiempo que el agua permanece en contacto con un determinado material, tendrá más oportunidades de interactuar con dicho material.
- Los caminos o rutas que sigue el agua en el sistema: estos caminos definen las características de los materiales con los que el agua interactúa.

Por todo ello, la composición de las aguas naturales está dominada principalmente por la atmósfera y las rocas que forman la corteza terrestre. A pesar de ello, no hay que olvidar el papel que realiza la biota que interviene física y químicamente en multitud de reacciones que tienen lugar en el medio acuático. Así pues, dentro de los factores naturales que afectan a la composición de las aguas se podría hablar de tres tipos: geológicos, atmosféricos y biológicos [Webster y Valett, 2007].

La composición de las aguas naturales se ve fuertemente influenciada por la ganancia y pérdida de solutos que tienen lugar mediante procesos físicos y químicos. En su mayor parte, muchos componentes de la corteza terrestre se encuentran sometidos a procesos geológicos, por lo que pueden pasar a formar parte de un determinado ecosistema acuático como productos de la erosión de las rocas, actividad volcánica o a través de la atmósfera, principalmente [Bailey y col., 2002].

Por lo general, las aguas reflejan las características y propiedades químicas del terreno sobre el que se encuentran. No obstante, la abundancia relativa de los elementos que forman parte de las masas de aguas varía según el continente, región o zona. El clima, la topografía, la geografía y la actividad biológica son los principales factores que determinan la composición natural de las aguas. Los elementos se encuentran formando parte de compuestos (ácidos, bases, sales), los cuales sufren un proceso de disociación al reaccionar con el agua. Además de las interacciones con la litosfera, son de destacar las importantes interacciones que este medio tiene con la

atmósfera (mediante intercambio de gases, deposición de partículas atmosféricas,...), y con la hidrosfera (aportes fluviales,...), especialmente en áreas industriales y regiones volcánicas [Roldán y Ramírez, 2008].

Los sistemas acuáticos naturales pueden considerarse como un conjunto de compartimentos interrelacionados entre sí, en los que se desarrollan procesos físicos, químicos, geológicos y biológicos. El agua líquida es el constituyente más característico del medio acuático, pero existen otros compartimentos, entre los que se incluyen fundamentalmente materias sólidas (partículas en suspensión y fondos marinos sedimentarios y rocosos) y biota, entre los que se establecen interacciones mediante procesos de transporte de masa y transferencia de energía, lo cual puede conllevar cambios, ya sea a escala local o global, en la composición química de los mismos [Manahan, 2010].

Por todo ello, las aguas en su estado natural contienen una amplia variedad de sustancias o especies químicas, debido fundamentalmente a la gran capacidad que tiene el agua para disolver, transportar y reaccionar con las sustancias, las cuales finalmente pasarán a formar parte del medio en forma disuelta, de partículas en suspensión o en disolución coloidal. De ahí que resulte difícil definir la contaminación hídrica y determinar su grado si no se conocen las características físicas, químicas y biológicas de una determinada masa de agua con carácter previo a que se produzca dicha contaminación.

En los ecosistemas acuáticos, la composición de las aguas es bastante heterogénea. Los gases más abundantes son principalmente los provenientes de la disolución de gases atmosféricos como CO_2 , N_2 y O_2 ; los producidos por la actividad y metabolismo de los seres vivos (CO_2 y O_2); y los originados por la descomposición aerobia o anaerobia de los mismos (CO_2 , CH_4 , H_2S , NH_3). También se pueden encontrar cationes como Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Fe^{2+} ó Fe^{3+} , etc., provenientes de la disolución de materiales de la corteza terrestre y aniones como HCO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , F^- , NO_3^- , etc. En el agua de mar, los componentes mayoritarios son los iones Na^+ y Cl^- y, en menor proporción, SO_4^{2-} y Mg^{2+} . En el agua de río, predominan los iones Ca^{2+} y HCO_3^- (procedentes de la erosión del CaCO_3). Por otro lado, las aguas subterráneas contienen mayores concentraciones de sales disueltas que las aguas superficiales, debido a que estas aguas discurren por materiales geológicos que contienen minerales solubles. Se encuentran en ellas altas concentraciones de iones tales como Ca^{2+} , HCO_3^- , Na^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , y Cl^- (de 1 a 1.000 mg L^{-1}) y algunos elementos tóxicos como As y Se. En general, se puede decir que también pueden encontrarse en las aguas naturales elementos como As, Ba, Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Sr, y Zn, a muy baja concentración, siendo menor ésta en agua de mar que en aguas superficiales [Orozco-Barrenetxea, 2008; Namiesnik y Szefer, 2010]. Destaca también la presencia de especies ácidas como el

CO₂ o los ácidos orgánicos provenientes de la oxidación de la materia orgánica, y la existencia de otras especies inorgánicas como las arenas (sílice) y las arcillas (aluminosilicatos) procedentes de la erosión y el ataque químico del agua sobre los materiales terrestres.

La materia orgánica presente en las aguas (disuelta o particulada) es principalmente de origen biológico, aunque otra fracción puede entrar en el medio mediante escorrentía o drenaje o sobre partículas atmosféricas o vapores. Así, la mayor parte procede de las actividades y procesos metabólicos de los organismos marinos (como fotosíntesis, alimentación, excreción, descomposición de organismos, ect.). Dentro de la materia orgánica, destacan los hidratos de carbono, urea, aminoácidos, pigmentos orgánicos naturales, lípidos, alcoholes, proteínas, polisacáridos y vitaminas [Tait y Dipper, 1998; Beckett y Ranville, 2006; Manahan, 2010]. No obstante, dentro de los componentes de la materia orgánica en ecosistemas acuáticos, son especialmente importantes las sustancias húmicas. Las sustancias húmicas están formadas por una mezcla heterogénea de materiales orgánicos y pueden encontrarse en suelos, sedimentos, turbas, lagos y ríos. Proviene de la descomposición de plantas y animales. Dentro de las sustancias húmicas solubles en agua, se puede distinguir el ácido húmico y el fúlvico. Los denominados ácidos húmicos comprenden pesos moleculares entre 200-10.000, mientras que los segundos se encuentran en un rango entre 500-2.000. Es posible separar la mezcla de estos ácidos acidificando dicha mezcla hasta alcanzar un pH inferior a 2. De esta forma, el ácido húmico precipita frente al fúlvico que permanece disuelto. Las sustancias húmicas poseen una coloración marrón, por lo que aportan esta coloración a las masas de agua que los contienen, en especial ríos y lagos. Además, se cree que estas sustancias posiblemente tengan influencia negativa sobre la salud humana, por lo que hay una necesidad imperiosa de eliminar estas sustancias de las aguas, sobre todo de las aguas potables mediante la utilización de diversos tipos de adsorbentes [Moriguchi y col., 2005]. Este tipo de compuestos son recalcitrantes, formados por mezclas de macromoléculas polielectrolíticas dispersas que existen de manera natural en el medio ambiente. La estructura básica de las sustancias húmicas comprende una molécula aromática central altamente sustituida con varios grupos funcionales (principalmente carboxilos e hidroxilos), cadenas alifáticas o incluso carbohidratos unidos a proteínas periféricas. Debido a su capacidad para unirse químicamente a metales y compuestos orgánicos, las sustancias húmicas pueden desempeñar un doble papel mediante el cual regulan la migración de contaminantes al medio: en el caso de capas o cubiertas húmicas depositadas sobre suelos y sedimentos, éstas pueden actuar como sustratos reactivos para la adsorción de contaminantes; mientras que si se trata de sustancias disueltas o particuladas, las sustancias húmicas pueden llegar a facilitar la solubilización y transporte de contaminantes como metales, radionucleidos y compuestos orgánicos [Perminova y col., 2012; Burlakovs y col., 2013].

1.2. Contaminación de las aguas

Con frecuencia se habla de la **contaminación** y se conocen los perjuicios que ocasiona en el medio ambiente. Sin embargo, desde siempre ha existido una gran diversidad de definiciones para tal término, por lo que muchos autores han optado por definir la contaminación en base a la definición presentada en el Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprobó el texto refundido de la Ley de Aguas (BOE núm. 176, de 24 de julio de 2001). Así, se entiende por contaminación *“la acción y el efecto de introducir materias o formas de energía, o inducir condiciones en el agua que, de modo directo o indirecto, impliquen una alteración perjudicial de su calidad en relación con los usos posteriores o con su función ecológica”*.

También existe el término **polución**, que puede ser empleado indistintamente junto con el de contaminación. No obstante, existen ciertos autores y organismos que diferencian entre contaminación y polución. Se considera *contaminante* a una sustancia que se presenta en un medio donde normalmente no es habitual, o en una concentración por encima de su concentración o nivel de fondo, independientemente de que cause o no efectos adversos. Por otro lado, se define *polutante* como un contaminante que causa efectos biológicos adversos en la naturaleza. En base a estas definiciones, todos los polutantes son contaminantes pero no todos los contaminantes se consideran polutantes. Esto se explica por el hecho de que las sustancias introducidas en un determinado medio pueden ser más o menos biodisponibles para los organismos, en función de su forma química, factores intrínsecos al medio, compartimento en el que se encuentre y de las reacciones conductuales o fisiológicas de la biota expuesta a dicha sustancia [Chapman, 2007].

La cantidad de sustancias y compuestos que, mediante una vía u otra, pasan a formar parte de los ecosistemas acuáticos es bastante elevada y puede proceder de fuentes muy diversas. Éstos suelen clasificarse en diversas categorías, entre las que se incluyen la contaminación química, la física, la radioactiva, la biológica y la estética. Sin embargo, han sido los contaminantes químicos los que han causado una mayor preocupación con respecto al estado de calidad de las aguas. Dentro de este grupo, destacan los productos químicos orgánicos, inorgánicos y metales pesados, principalmente derivados de efluentes industriales, agrícolas y de la escorrentía urbana [Manahan, 2010]. Además, se puede distinguir entre contaminación acuática puntual (en el caso de que se produzca por un foco emisor determinado e identificable afectando a una zona concreta) o difusa (cuando el origen no está claramente definido y se ven afectadas zonas amplias en las que coexisten múltiples focos de emisión). En sentido general, se pueden considerar como principales fuentes de contaminación del

medio hídrico las aguas residuales urbanas, las industriales, las agrícolas y ganaderas, y la atmósfera [Haus y col., 2007].

Muchas sustancias muestran cambios en su naturaleza cuando son vertidas al mar: los compuestos se pueden disociar o ionizarse, los metales pueden cambiar su valencia o estado de oxidación o formar complejos con moléculas orgánicas, las sustancias pueden disolverse en agua de mar o llegar a adsorberse sobre la materia particulada y ser transportadas hasta el fondo marino. Estos cambios físico-químicos determinan el grado de disponibilidad de los distintos elementos para los organismos marinos, así como los efectos que pueden tener sobre ellos.

Por todas estas razones, una simple medida aislada o puntual de la concentración de una determinada sustancia en un medio acuoso natural no refleja la totalidad de los efectos que ésta puede producir. Es decir, el estudio de la posible contaminación de un determinado ecosistema acuático precisa de estudios exhaustivos a nivel global de especiación y disponibilidad.

1.2.1. Principales fuentes de vertidos en el medio acuático

Existen focos de contaminación de procedencia no antropogénica en las aguas, tales como el polvo que va desde los distintos desiertos a los ríos y océanos, arrastrando hasta los ecosistemas marinos inmensas cantidades de materia sólida, así como nutrientes químicos. Otra fuente natural es la superficie o suelo continental que, tras ser erosionado por la lluvia, alcanza y mancha la superficie del mar en numerosas áreas. Estas manchas de limos y lodos se dispersan siguiendo las costas, imposibilitando el paso de una parte de la luz e impidiendo así la correcta producción del proceso de fotosíntesis propio de las plantas acuáticas. Las consecuencias también son perceptibles en alta mar, encontrándose zonas sin oxígeno o "zonas muertas", las cuales pueden alcanzar áreas muy extensas. Las algas pueden sufrir las consecuencias de los dañinos compuestos ricos en nitrógeno y fósforo, procedentes de la agricultura, gases de escape, emisiones de fábricas, aguas residuales, etc. A su vez, esto provoca elevadas floraciones de fitoplancton, cuyo rápido crecimiento y descomposición disminuye las concentraciones de oxígeno, lo cual afecta al propio fitoplancton así como al resto de especies de los ecosistemas acuáticos.

Sin embargo, las principales causas de la contaminación de las aguas son de origen antropogénico, como los vertidos desde fábricas, ciudades y campos, aguas residuales urbanas no depuradas y fangos concentrados de depuradoras, residuos de fertilizantes y pesticidas de zonas agrícolas, suelo erosionado de cuencas forestales mal

gestionadas por el hombre, así como un elevado número de productos secundarios, escorias, humos y residuos procedentes de fundiciones [Caldecott, 2011].

Las principales fuentes de vertidos causantes de la contaminación de las aguas naturales son [Seoáñez-Calvo y col., 2000a; Clark, 2001]:

Desagües directos

Las principales fuentes de estas aportaciones son a través de canalizaciones que descargan directamente en el medio acuático, destacando algunas zonas como por ejemplo:

- *Estuarios.* Históricamente, los puertos comenzaron a establecerse sobre estuarios, convirtiéndose así en centros de población e industrias. Tanto los residuos urbanos como industriales eran vertidos directamente al estuario, sin ningún tipo de tratamiento previo. De esta forma, numerosos estuarios se vieron gravemente contaminados a finales del siglo XIX.
- *Ciudades costeras.* Actualmente, muchas ciudades costeras se caracterizan por ser zonas poco industrializadas; aunque sí lo fueron en el pasado. Numerosos residuos municipales sin tratar eran vertidos al mar a través de desagües y, como consecuencia, numerosas playas locales y centros turísticos costeros eran contaminados. Estos aportes disminuyeron significativamente con la implantación de emisarios para la dispersión de los vertidos lejos de la costa y, sobre todo, cuando se introdujeron procesos de depuración de las aguas residuales generadas.
- *Industrias costeras.* Debido al aumento de la preocupación por conservar ríos y lagos para suministros de agua potable, nuevas industrias con demandas de grandes volúmenes de agua (por ejemplo, para agua de refrigeración y eliminación de residuos) han tendido a situarse en la costa. Además, instalaciones destinadas a la maricultura costera (como son las granjas de salmón) se han establecido en estas áreas, vertiéndose en ellas comida no consumida, excremento de peces y pesticidas.

Aportes de ríos

Los ríos desembocan a través de sus estuarios en el mar, junto con todos los contaminantes que éstos arrastran. Los principales contaminantes presentes en los ríos llegan a ellos procedentes de sus cuencas hidrográficas. Entre ellos destacan los siguientes:

- Los desechos orgánicos son susceptibles de ataques bacterianos y, dependiendo de la distancia de los principales vertidos a la desembocadura del río, la carga orgánica puede ser altamente reducida de forma que finalmente entre en el mar un contenido orgánico relativamente insignificante.
- Pesticidas y fertilizantes procedentes de la agricultura y silvicultura son arrastrados desde la tierra y los cultivos, principalmente por la lluvia (lixiviación), entrando posteriormente en los ríos y cuerpos de agua y alcanzando, finalmente, el mar.
- Petróleos y aceites que son arrastrados desde caminos y carreteras por las escorrentías de las aguas pluviales, entran por lo general en el sistema de alcantarillado, el cual conduce a estos compuestos hasta los ríos y el mar.

Todos los materiales terrestres pueden ser arrastrados y lixiviados mediante las precipitaciones hasta pasar a formar parte de ríos y corrientes. La entrada final de éstos al mar, contribuye al aumento de los vertidos que se producen sobre el mar y la contaminación de éste.

Embarcaciones

Son numerosos los barcos o embarcaciones destinados al transporte de sustancias tóxicas, petróleo, gas natural licuado, pesticidas, sustancias químicas industriales, entre otras. Naufragios y otros accidentes ocurridos principalmente en el mar, pueden ocasionar vertidos accidentales de estas sustancias y el gran tamaño de algunos buques superpetroleros (que pueden transportar hasta 350.000 toneladas de petróleo crudo), implica que, cuando los accidentes ocurren, las consecuencias pueden ser realmente catastróficas. Los accidentes de grandes petroleros son un obvio ejemplo.

Otras embarcaciones son responsables de vertidos menos dramáticos de sustancias al medio acuático, ya sea como consecuencia de accidentes o en el curso de operaciones rutinarias. Hay ocasiones en las que se han llegado a producir naufragios totales de barcos con la consecuente pérdida de éstos, y otras en las que sólo se ha perdido parte del cargamento transportado en la borda a causa de fuertes tormentas. En casi todos los casos el cargamento es rescatado pero, inevitablemente, los materiales nocivos y peligrosos que entran en contacto con el agua producen contaminación en mayor o menor grado.

Otra fuente de contaminación procedente de las embarcaciones son las aguas de lastre que liberan los barcos en el curso de sus operaciones de rutina. Estas aguas, ricas en aceites, sedimentos, aguas de sentina y aguas de lavado de los tanques de carga, no

son liberadas siempre de forma legal. Además, se desecha mucha basura, entre la cual destacan los plásticos, que a veces también es vertida sin control.

Vertidos

Una gran variedad de materiales pueden ser vertidos en los ecosistemas acuáticos en vertederos designados a tal efecto, sobre todo de tipo marino.

- Lodos de dragado. A menudo los canales de navegación en los ríos, estuarios y las entradas a los puertos requieren operaciones de dragado, con el fin de mantenerlos transitables, siendo vertido el material extraído en mar abierto. Estos lodos de dragado, particularmente los procedentes de estuarios industrializados, pueden contener apreciables cantidades de metales pesados y otros contaminantes potenciales, los cuales serán movilizados y transferidos a las zonas de vertido.
- Lodos de aguas residuales. Hasta hace poco los fangos procedentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales eran vertidos al mar en cantidades considerables, pero esta práctica ha cesado en muchas áreas. El motivo es que el lodo tiene un alto contenido orgánico y, además, está contaminado con metales pesados, aceites, grasas y otras muchas sustancias.
- Lodos industriales. La composición de estos lodos depende de la industria de la que procedan, pudiendo contener gran cantidad de iones metálicos, óxidos, carbonatos, ácidos, bases, sales, etc., cuando se trata de industrias basadas en el tratamiento de minerales. Igualmente, determinados lodos industriales son vertidos al mar a una temperatura relativamente elevada, lo cual puede llegar a resultar desfavorable para el ecosistema acuático.
- Otros materiales de desecho. Las cenizas volantes procedentes de centrales térmicas que queman fuel-oil o carbón, desechos de mina de carbón y otros residuos industriales particulados, han sido vertidos al mar en numerosos lugares, así como otros materiales peligrosos tales como residuos radiactivos y restos de municiones.
- Actividades industriales en alta mar. En este grupo se engloban una gran variedad de actividades que generan diversos vertidos y/o alteraciones en el mar. Incluyen plataformas de prospección y extracción de petróleo, extracción de arena y grava, y extracción de minerales, como los nódulos de extracción de manganeso, que en el futuro serán importantes para la extracción de este metal.

Aportaciones atmosféricas

Las emisiones, tanto naturales como antropogénicas, que llegan a la atmósfera, en forma gaseosa o particulada, pueden volver directamente a la tierra o a las aguas a través de deposiciones atmosféricas (vía seca o húmeda). Además, algunos de los contaminantes que hayan sido depositados sobre la tierra, pueden ser lixiviados y llegar a los ríos y posteriormente al mar.

Estos aportes son significativos, en su mayor parte, a escala regional o incluso global, más que local, pues el transporte en la atmósfera puede alcanzar grandes distancias. Existen demasiados factores relacionados con los aportes atmosféricos a las aguas que se desconocen y requieren ser estimados con precisión; pero, por lo general, se estima que son muy importantes y que representan la mayor parte de la contribución de contaminantes.

Hace algunos años determinados estudios estimaron que la mitad del aporte global de plomo al mar (procedente tanto de fuentes naturales como antropogénicas) procedía de las emisiones de vehículos que usaban combustibles con aditivos que contenían plomo. Estas emisiones alcanzaban la atmósfera y, posteriormente, volvían a la superficie terrestre mediante fenómenos de deposición atmosférica, llegando así también a los océanos. Afortunadamente hay datos que muestran que la contribución de los gases de escape de los vehículos ha disminuido recientemente por la prohibición de este tipo de aditivo en las gasolinas, por lo que el rango estimado de estos aportes ha sido menor en los últimos años [Annibaldi y col., 2009]. Algo parecido pudo observarse en el caso del mercurio. Además de los aportes procedentes de la actividad volcánica y de la erosión de minerales que contienen mercurio, así como el uso de mercurio y compuestos mercuriales en la industria y agricultura, se detectó un suplemento derivado de la combustión de combustibles fósiles (principalmente carbón) y de la incineración de residuos. A pesar de que el carbón contiene cantidades muy pequeñas de mercurio, éstas pueden pasar a la atmósfera (por su gran volatilidad) al ser quemado en grandes cantidades en todo el mundo, llegando a constituir la mayor contribución de este metal al mar [Wang y col., 2004; Sánchez y col., 2005].

Es, pues, evidente que la liberación no controlada de determinados compuestos hacia la atmósfera puede suponer una contribución muy importante, respecto a los niveles de fondo, de estos contaminantes en las aguas.

1.2.2. Contaminantes en ecosistemas acuáticos

De forma general, muchos de los compuestos de preocupación medioambiental son constituyentes naturales de los ecosistemas, aunque suelen encontrarse en concentraciones consideradas no nocivas. Lo que resulta preocupante es el incremento de dichas concentraciones como consecuencia principalmente de las actividades antropogénicas. Por otro lado, existen contaminantes que únicamente existen en la naturaleza introducidos por el ser humano, al tratarse de sustancias puramente sintéticas, como son los clorofluorocarbonos [Radojevic y Bashkin, 2006].

Aunque el número de contaminantes que se pueden llegar a detectar en un determinado ecosistema acuático es amplio y variado, se pueden agrupar fundamentalmente en 3 grupos básicos, *orgánicos*, *inorgánicos* y *biológicos* [Gupta y Ali, 2013]:

- Los *contaminantes orgánicos* son compuestos que alteran y degradan la calidad del agua y constituyen una gran amenaza para la salud humana y la vida acuática. Algunos de los compuestos considerados contaminantes orgánicos son:
 - Alimentos o restos de alimentos, los cuales pueden contener sustancias consumidoras de oxígeno, aceites y grasas.
 - Hidrocarburos derivados del petróleo, como carburantes (gasolina, diesel, fuel-oil), lubricantes (aceites para motores) y otros subproductos.
 - Subproductos derivados de los procesos de desinfección química del agua potable (DBPs), como por ejemplo el cloroformo.
 - Compuestos orgánicos volátiles (VOCs), tales como disolventes industriales, liberados al medio por transporte o almacenamiento inadecuados.
 - Plaguicidas, constituidos por una gran variedad de halocarburos y otros compuestos químicos.
 - Desechos procedentes de árboles y arbustos como consecuencia de operaciones de tala de bosques.
 - Disolventes clorados, densas fases líquidas no acuosas que pueden alcanzar la parte inferior de muchos reservorios acuáticos.
 - Bifenilos policlorados (PCBs).

Existe una amplia variedad de contaminantes orgánicos pertenecientes a la categoría definida como *contaminantes orgánicos persistentes* (POPs), caracterizados principalmente por ser resistentes a la degradación medioambiental. Su alta estabilidad hace que persistan en el medioambiente, pudiendo ser transportados a largas distancias. Su gran peligrosidad radica en el hecho de que pueden bioacumularse en tejidos animales y humanos y sufrir

procesos de biomagnificación a lo largo de la cadena trófica. Algunos de estos contaminantes pueden provenir de fuentes naturales, aunque la mayoría proceden de origen humano, es decir, son creados intencionadamente o como subproductos de procesos industriales [Xu y col., 2013a].

- Los *contaminantes inorgánicos* pueden encontrarse de forma natural en la naturaleza, pero debido al desarrollo industrial y a otras actividades humanas, estos contaminantes son vertidos al medio ambiente en altas concentraciones. Los contaminantes de mayor preocupación encontrados en aguas pluviales urbanas son Cd, Cu, Pb, Zn, N, P, nitratos, nitritos, amonio, y fosfatos. Éstos son empleados por el hombre con diversos fines y, por lo general, son altamente tóxicos para el ser humano y el medio ambiente. Algunos hechos causantes del aumento de la concentración de estos contaminantes en el medio ambiente son:
 - Emisiones o vertidos industriales, que pueden incrementar la acidez del medio receptor. En este sentido, destaca el dióxido de azufre (SO₂) procedente de las centrales eléctricas.
 - Fertilizantes ricos en nitratos y fosfatos, compuestos hallados fundamentalmente en escorrentías de zonas agrícolas.
 - Residuos químicos generados como subproductos en numerosas industrias.
 - Compuestos nitrogenados procedentes de desechos urbanos.
 - Partículas, polvo o sedimento procedentes de zonas en construcción y de operaciones de tala, corte, quemado o deforestación.
 - Metales pesados procedentes de emisiones de vehículos, drenaje ácido de minas y residuos industriales, entre otras causas.
- El grupo correspondiente a los *contaminantes biológicos* incluye bacterias, virus, hongos, moho, ácaros del polvo doméstico y polen, entre muchos otros. Estos contaminantes pueden provenir de fuentes diversas. El ser humano se encuentra expuesto continuamente a este tipo de contaminantes; sin embargo, los efectos sobre la salud dependen de factores como el tipo, la cantidad de contaminante y el individuo expuesto.

Como ya se ha indicado, la aportación más importante en cuanto a contaminantes en el medio acuático es la causada por la actividad humana, sobre todo mediante vertidos industriales. Dada la limitada eficiencia de depuración de los sistemas convencionales de tratamiento de aguas de desecho, los efluentes vertidos pueden conllevar en muchos casos a una acumulación de contaminantes, los cuales son recibidos por determinados cuerpos de agua (generalmente el mar) con serias consecuencias sobre los ecosistemas [Gao y col., 2009]. En la Tabla I.1 se muestran las

principales industrias emisoras y la composición de sus vertidos más habituales. Mención especial merece el grupo de los contaminantes constituido por los **metales pesados**, vertidos al medio en un gran número de industrias, en mayor o menor proporción. En ellos se centran los trabajos de nuestro grupo de investigación, así como la presente Tesis Doctoral. Por ello, los apartados posteriores se centran íntegramente en este grupo de contaminantes.

Tabla I.1. Importantes industrias contaminantes y sus principales vertidos [Gupta y Ali, 2013]

Industrias	Contaminantes inorgánicos	Contaminantes orgánicos
Refinerías	Sulfuros, Hg, Cr, Sb	Aceites, fenoles, dioxinas, furanos, PAHs, PCBs
Producción y procesado de metales	As, Cd, Pb, Se, Fe, Zn, Al, Ni, cianuros	PCBs, PAHs, dioxinas, aceites,
Industria de productos químicos orgánicos	-	Fenoles, ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados
Industria del coque	Amoniaco, cianuros, sulfuro de hidrógeno	Fenoles, , alquitrán, hidrocarburos, tiocianatos, partículas orgánicas en suspensión
Industrias del papel y cartón	Sulfitos, cloro libre	Metilmercaptanos, pentaclorofenol, aldehídos, cetonas y materia particulada orgánica
Refinado de petróleo	Sulfuros, cloruros, sulfatos	Derivados del petróleo, fenoles, surfactantes
Industria metalúrgica	Cu, Pb, Cd, Cr, Zn	-
Industria de polímeros y plásticos	Sulfatos	Estireno, acetonitrilo, acrilatos, fenoles, hidrocarburos aromáticos, aldehídos, ciclohexano, ácidos orgánicos y materia particulada orgánica
Industria textil	Cr	Tintes, detergentes
Industria de la cerámica	Fluoruros	-
Industria alimentaria	Metales alcalinos, fosfatos	Aminoácidos
Industria del curtido	Cromo, sulfuros	Fenoles, ácido tartárico
Industria de transformación de la madera	Zn, sulfuros, álcalis	-

Dado que los contaminantes del agua pueden provenir de distintas fuentes, se pueden establecer *marcadores de contaminación del agua*, que sean indicativos de la procedencia de dichos contaminantes. Algunos herbicidas pueden servir como marcadores de la escorrentía agrícola [Hermosin y col., 2013]. Tradicionalmente se usan las bacterias fecales coliformes provenientes de fuentes domésticas, como marcadores de contaminación microbiana o viral [Soller y col., 2010; Zhu y col., 2011]. Potencialmente, los metabolitos humanos endógenos así como los constituyentes de los alimentos, los productos farmacéuticos y los productos de cuidado personal, pueden indicar la entrada de contaminación desde fuentes del alcantarillado. Así, la cafeína procedente del consumo de café, té y otras bebidas puede ser un marcador muy útil de fuentes domésticas de contaminación del agua [Daneshvar y col., 2012; Manahan, 2010].

1.3. Contaminación acuática por metales pesados

1.3.1. Metales pesados: definición y principales características

En las últimas décadas se ha observado una tendencia bastante generalizada en cuanto al empleo erróneo del término "*metal pesado*". Con frecuencia, es empleado para designar a un grupo heterogéneo de metales y semimetales (metaloideos), así como sus correspondientes compuestos. Generalmente, al término metal pesado han ido asociados otros como contaminación, toxicidad o ecotoxicidad. De este modo, el empleo de este término ha llevado a confusión en muchos casos, por la tendencia de asumir que todos los "metales pesados" poseen propiedades tóxicas o ecotóxicas, lo cual no es cierto [Duffus, 2002].

En la literatura científica existen numerosas definiciones para el término "metal pesado". Convencionalmente, el término "*pesado*" implica alta densidad, mientras que el término "*metal*" se refiere a un elemento metálico puro o bien una aleación metálica. De este modo, el término "*metal pesado*" últimamente ha venido siendo aplicado al grupo de metales y metaloides con una densidad atómica mayor de 5 g cm^{-3} [Berkowitz y col., 2008]. Sin embargo, el conocimiento de la densidad contribuye muy escasamente a la predicción de los efectos biológicos de los metales; particularmente debido a que el metal o sus aleaciones no son, en la mayoría de los casos, las especies reactivas que reaccionan con los organismos en cuestión.

Prácticamente todos los metales de transición pueden considerarse metales pesados. Excepción a esta definición es el titanio, que se considera metal pesado aun teniendo una densidad inferior ($4,5 \text{ g cm}^{-3}$) [Domènech y Peral, 2006].

Las principales propiedades que caracterizan a los metales pesados y los diferencian de otros elementos y compuestos químicos son las siguientes [Fairbrother y col., 2007]:

- Son constituyentes naturales del medio ambiente y su concentración varía según el área geográfica donde se encuentren.
- Todos los ecosistemas contienen mezclas naturales de metales y éstos entran a menudo en la naturaleza en forma de mezclas, con lo que se debe prestar especial atención a los efectos sinérgicos, antagónicos o aditivos que pueden presentar.
- Algunos metales son esenciales para la salud humana, de animales, plantas y microorganismos. Tanto si existen deficiencias como excesos de estos metales esenciales en organismos, se pueden producir efectos adversos nutricionales.
- La química de los metales influye notablemente en su destino y en los efectos que pueden causar en humanos y demás receptores ecológicos. A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales no se crean ni se destruyen mediante procesos químicos o biológicos. Sin embargo, estos procesos pueden transformar los metales, bien modificando su estado de oxidación, o convirtiéndolos en compuestos o derivados orgánicos o inorgánicos.
- La toxicocinética y la toxicodinámica de los metales dependen del metal, de la forma del metal o del compuesto metálico y la capacidad del organismo de regular y/o acumular el metal. Pueden presentarse como especies biodisponibles para los organismos vivos y, en tales casos, se bioacumulan y pueden sufrir procesos de biomagnificación a través de la cadena trófica.

Éstos se encuentran asociados comúnmente a problemas de contaminación y toxicidad medioambiental, incluso a bajas concentraciones. Al menos 20 de ellos son conocidos por ser altamente tóxicos, entre los que destacan especialmente el mercurio (Hg), cadmio (Cd), plomo (Pb) y arsénico (As), por los graves efectos que pueden llegar a causar en el ser humano [Castro-González y Méndez-Armenta, 2008]. De gran interés son también el cromo (Cr), cobre (Cu), níquel (Ni), cinc (Zn) y talio (Tl), los cuales son liberados al medio ambiente en cantidades suficientes como para constituir un potente

riesgo para el equilibrio de los ecosistemas y para la salud humana [Guillén y col., 2012; Turner y Furniss, 2012].

Por tanto, características como su alto grado de persistencia en el medio, su tendencia a la bioacumulación en la cadena trófica y, en ciertos casos, su elevada toxicidad incluso a bajas concentraciones, hacen que los metales pesados sean considerados uno de los contaminantes ambientales más peligrosos y por lo tanto, un riesgo importante para los seres vivos.

1.3.2. Los metales pesados en los organismos vivos y su toxicidad

Ciertos metales y semimetales se consideran imprescindibles para la vida, ya que se encuentran involucrados en diversos procesos metabólicos y celulares de los organismos vivos, actuando como cofactores en numerosas enzimas. Éstos participan principalmente actuando como ácidos de Lewis o formando quelatos [Devlin, 2010; House, 2013]. No obstante, la presencia de algunos metales a determinadas concentraciones puede alterar la fisiología de los seres vivos desencadenando efectos adversos, deterioro e incluso la muerte del individuo [Barchowsky, 2010].

En los sistemas biológicos, los elementos se pueden agrupar en tres categorías: elementos *mayoritarios*, tales como C, H, O y N; elementos *minoritarios*, donde se incluyen el Ca, Cl, Mg, P, K y Na; y los restantes elementos considerados *traza* que forman parte de los organismos. La proporción de los mismos en la masa total suele ser de aproximadamente un 96%, un 3,6% y un 1%, respectivamente. Los primeros son constituyentes de las estructuras biológicas, los elementos minoritarios mantienen el balance de electrolitos en los procesos fisiológicos y los elementos traza participan de las reacciones metabólicas favoreciendo el crecimiento y desarrollo saludable de los organismos [Fifield y Haines, 2000].

Desde un punto de vista biológico, los elementos traza se clasifican en *esenciales* y *no esenciales* o tóxicos. Los elementos esenciales no pueden ser sustituidos por otros en su papel bioquímico específico y tienen una influencia directa en el organismo, por lo que si los niveles no son los adecuados los ciclos metabólicos se dificultan. Es decir, la ausencia de los elementos esenciales puede llegar a afectar a determinados procesos biológicos, haciendo que no se desarrollen de manera correcta y provocando en situaciones límite daños importantes en los organismos, incluso la muerte. A este grupo de elementos pertenecen B, Co, Cu, Cr, Fe, I, Mn, Mo, Ni, Se, Si, V y Zn. En general, estos elementos actúan en procesos tales como la respiración, fotosíntesis, asimilación de nutrientes; algunos actúan como metaloenzimas en los sistemas de transferencia de electrones (Cu, Mn, Ni, Fe, Zn) o como catalizadores en los procesos

de óxido-reducción (Cu, Co, Fe, Mo) [Hänsch y Mendel, 2009; Nitschke y col., 2013]. En humanos o animales, un exceso puede producir además síndromes, enfermedades y malformaciones. Actúan en los procesos de permeabilidad de las membranas celulares, en la conducción nerviosa, en las contracciones de los músculos y participan de la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y ácidos grasos. Así pues, tanto una deficiencia como un exceso de estos elementos esenciales pueden producir trastornos metabólicos [Rojas y col., 1999; Muñoz-Olivas y Cámara, 2001; Crichton, 2012a].

Sin embargo, otros elementos como Be, Ag, Al, Am, As, Cs, Cd, Cr(VI), Hg, Pb, Pu, Sb, Sr, o U, son considerados extremadamente peligrosos para la vida dada su elevada toxicidad incluso a bajas concentraciones [Bjerregaard y Andersen, 2007; Crichton, 2012b].

Cuando se superan los niveles máximos permitidos, todos estos elementos (tanto esenciales como no esenciales) pueden afectar al metabolismo normal de un organismo, bien porque se unan a biomoléculas no específicas o porque provoquen daños oxidativos debido a su habilidad para catalizar reacciones redox [House, 2013]. Esto puede terminar en la desactivación de reacciones enzimáticas esenciales, dañar las estructuras celulares y modificar el ADN. En humanos, exposiciones cortas a altos niveles de estos elementos pueden causar síntomas de toxicidad aguda, mientras que exposiciones largas de algunos de ellos a niveles más bajos pueden acabar incluso en enfermedades como el cáncer [Berkowitz, 2008]. En la Figura I.3 se muestran las distintas curvas dosis-respuesta, tanto para los *elementos esenciales* (a) como para los *no esenciales* (b).

En el caso de los elementos traza esenciales (Figura I.3 (a)), la región óptima horizontal refleja las concentraciones para un crecimiento adecuado, buena salud y reproducción eficaz, observándose que, tanto una deficiencia como un exceso, pueden causar efectos perjudiciales. Para los elementos no esenciales (Figura I.3 (b)), bajas concentraciones pueden llegar a ser tolerables, hasta alcanzar un punto crítico donde la concentración empieza a causar efectos tóxicos sobre el organismo.

Los organismos, en general, tienen mecanismos que les permiten tolerar pequeñas fluctuaciones en el aporte de elementos esenciales, pero una exposición prolongada puede exceder la capacidad homeostática del sistema y se originan efectos tóxicos, los cuales pueden llegar a producir la muerte en casos severos. Uno de los distintos sistemas de defensa frente a metales traza en organismos animales es la producción de metalotioneínas, proteínas con grupos -SH que se enlazan con metales como Cd y Zn, lo que permite que sean excretados sin causar daños en el organismo [Liu y Wang, 2011]. Por otro lado, en las plantas existen compuestos con funciones similares, las fitoquelatinas, involucradas en los procesos de homeostasis, tolerancia y detoxificación

de metales. Las fitoquelatinas son buenos bioindicadores en situaciones de estrés por la presencia de metales, especialmente para el Cd y otros como Cu, Zn, Hg, Ag, Ni y Pb [Abboud y Wilkinson, 2013]. A pesar de estos mecanismos, para la mayoría de los organismos, la exposición a metales pesados por encima de una concentración umbral puede ser extremadamente tóxica. Los de mayor importancia toxicológica y ecotoxicológica son: Hg, As, Cr, Pb, Cd, Ni y Zn [Castañé y col., 2003].

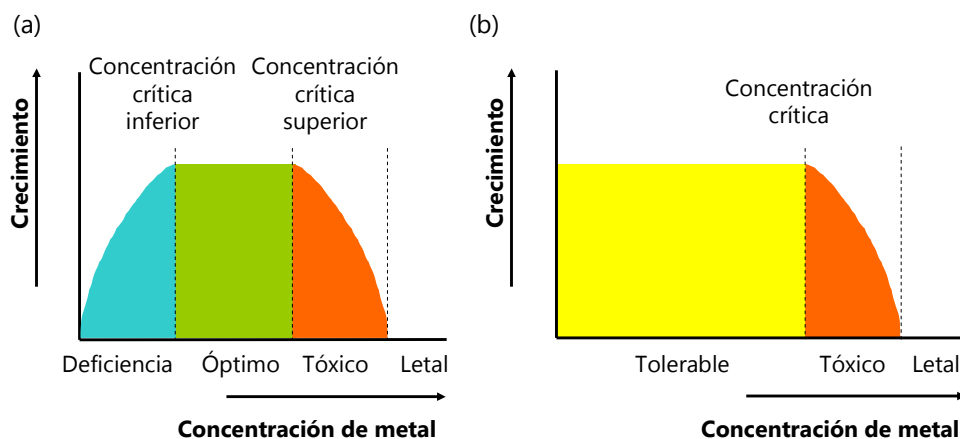


Figura 1.3. Respuesta de los organismos frente a distintas concentraciones de elementos (a) esenciales y (b) no esenciales [Imagen basada en Förstner y Wittmann, 1983]

Por su peligrosa toxicidad, la determinación de estos contaminantes es muy importante en controles ambientales, pero resulta especialmente compleja debido a las bajas concentraciones en las que estos elementos se encuentran, sobre todo en los ecosistemas acuáticos. En este contexto, es frecuente encontrar el término "metales traza" en referencia a estos metales pesados. Así, en ecosistemas acuáticos, se entiende como elementos traza aquellos que se encuentran en las aguas en concentraciones inferiores a 1 mg L^{-1} , pudiendo hablar de ultratraza cuando la concentración disminuye por debajo de $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ [Kennish, 1996].

Lo que hace tóxicos a los metales pesados no son sólo sus características propias, sino las concentraciones tan bajas a las que producen efectos adversos, lo que muchas veces depende del tipo de forma química en la que se encuentren [Muñoz-Olivas y Cámara, 2001]. Así, es el estado químico de un metal y no su concentración total el factor clave para comprender sus diferentes propiedades físico-químicas y sus efectos

sobre los organismos. Normalmente, cuando se estudia un metal en un ecosistema, se observa su comportamiento y las reacciones que produce, se predice la posible distribución de los diversos estados químicos mediante modelos termodinámicos, y, por último, se evalúan esas formas químicas mediante su determinación analítica, la cual puede verse dificultada si se presentan a bajas concentraciones [Azcue, 1993; Benjamin y Honeyman, 2000].

Respecto a la potencial toxicidad de los metales pesados sobre los organismos vivos, conviene considerar los siguientes términos: *bioacumulación*, *biomagnificación*, *bioconcentración* y *biodisponibilidad*, los cuales describen la conducta de los contaminantes en relación con los sistemas biológicos. Estos términos se definen a continuación [Neff, 2002; Markert, 2007; Nordberg y col., 2009]:

- **Bioacumulación:** Aumento progresivo de la cantidad de sustancia en un organismo o parte de él, como consecuencia de que la velocidad de absorción supera la capacidad del organismo para eliminar la sustancia.

La bioacumulación hace referencia al balance entre la cantidad de metal incorporado a los seres vivos y la cantidad que éstos son capaces de eliminar de su propio organismo. Como consecuencia de dicho balance se puede producir un aumento o una disminución neta del contenido metálico en el organismo. Este término tiene en cuenta el hecho de que aunque la dosis puntual de metales pesados esté por debajo de valores que puedan producir efectos adversos sobre los organismos, la continua acumulación en situaciones en las que el balance metálico ingreso/excreción sea positivo puede hacer que los niveles de los metales pesados en el organismo se incrementen con el tiempo hasta valores en los que se manifiesten efectos adversos. De forma genérica, la bioacumulación de metales pesados en organismos acuáticos aumenta bajo determinadas circunstancias, entre las que destacan el menor peso corporal (estadios larvarios y juveniles), menor salinidad, mayor temperatura del agua, ausencia de metales competidores (mayor bioacumulación en aguas de baja dureza) y mayor proximidad a la superficie del agua [Crompton, 2007].

- **Biomagnificación:** Secuencia de procesos por los cuales la concentración de una sustancia se ve incrementada en los organismos situados en niveles superiores de la cadena trófica con respecto a aquellos organismos que se encuentran en niveles inferiores.

De una forma más simple, es el proceso por el cual la concentración de una sustancia es mayor en un organismo que en su alimento [Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn, 2009]. Así, la cantidad de metal retenida por un organismo es

asimilada directamente por su depredador, que a su vez puede servir de alimento a otro organismo situado en un nivel superior de la cadena trófica, con el consiguiente incremento en la cantidad de metal acumulado por este último. Es difícil documentar los posibles casos de biomagnificación debido a los inconvenientes que se tienen para disponer de todos los organismos que componen la dieta del predador en la cadena trófica de un ecosistema en particular. Además, debe considerarse que cada individuo presenta una distinta exposición (longevidad) y diferente fisiología (detoxificación). Debido a que la biomagnificación y otros procesos de transporte requieren tiempo, el efecto nocivo de muchos compuestos no llega a ser evidente hasta el transcurso de décadas. Esto hace que sea difícil establecer una relación directa entre un contaminante específico y un cambio medioambiental [Libes, 1992].

- **Bioconcentración:** Proceso por el cual la concentración de una sustancia en un organismo aumenta con respecto a la que tiene en el ambiente al que está expuesto.

El término bioconcentración tiene en consideración la relación existente entre la incorporación de metales al organismo vivo y la concentración del metal en el medio abiótico donde habita el organismo. Este parámetro es más fácil de determinar que el de bioacumulación. El grado en el cual un metal se concentra en un organismo acuático viene dado por el factor de enriquecimiento (EF) o factor de bioconcentración (BCF), que se define como el cociente entre la concentración de metal en el material biogénico y la concentración del metal en el agua o sedimento [Campbell y col., 2002; Li y Zheng, 2011a]. Es de destacar que tanto el fitoplancton como el zooplancton, base fundamental de la cadena trófica en los sistemas acuáticos, presentan unos factores de enriquecimiento notables para ciertos elementos. Otros organismos que sobresalen son los moluscos por sus altos niveles de bioconcentración; los peces también concentran metales, aunque con factores de enriquecimiento notablemente menores a los anteriores organismos [Kennish, 1996]. Así, cada vez cobra más importancia la evaluación de la concentración de metales pesados en organismos acuáticos a través del análisis químico del contenido metálico en sus tejidos, con la doble intención de investigar la distribución y comportamiento de los metales en relación con la biota acuática, además de preservar tanto las especies animales como la salud humana, puesto que muchos de estos organismos sirven de alimento al hombre.

- **Biodisponibilidad:** Grado de absorción de una sustancia por un organismo vivo, normalmente expresada como una fracción de la cantidad total de la sustancia existente en el ambiente al que está expuesto.

Se define biodisponibilidad como la afinidad de un contaminante para ser absorbido o adsorbido por un organismo vivo, atravesando las barreras biológicas (membranas celulares o epitelios compuestos por una doble membrana lipídica con moléculas proteicas y canales cargados electroquímicamente), mediante procesos biológicos activos o procesos pasivos de tipo físico o químico. No obstante, algunos científicos diferencian entre disponibilidad externa o "bioaccesibilidad" y "biodisponibilidad interna" [Caussey y col., 2003; Peijnenburg y Jager, 2003], considerándose una sustancia bioaccesible aquella que puede entrar en contacto con el organismo y ser absorbida, y las sustancias biodisponibles, aquellas que tras ser absorbidas por el organismo pueden interactuar con las moléculas u órganos diana. Factores fisicoquímicos como la concentración del metal en el medio, su especiación química, la temperatura, la salinidad, la presencia o ausencia de agentes complejantes, la presencia o ausencia de otros metales, y factores propios de los organismos como el grado de impermeabilidad superficial, la etapa nutricional en la que se encuentre, o la etapa en el ciclo de muda, entre otros, determinan la biodisponibilidad de los metales hacia los organismos. En cualquier caso, la biodisponibilidad de los metales va a estar íntimamente ligada y va a depender de su especiación química.

1.3.3. Origen o fuentes de metales pesados en el medio acuático

Los metales (y semimetales) pesados existen de forma habitual en la naturaleza, ya que son componentes naturales de la corteza terrestre, por lo que existen diversos fenómenos de origen natural que pueden contribuir a incrementar las concentraciones de los mismos en el medio acuático, como erupciones volcánicas, aportes fluviales y aguas subterráneas, erosión y lixiviación de rocas, así como deposición de partículas transportadas por el viento. No obstante, en las últimas décadas, las actividades antropogénicas han supuesto una de las principales aportaciones de este tipo de contaminantes en las aguas, observándose un aumento continuo en las concentraciones de algunos metales pesados.

Las fuentes antropogénicas emisoras de metales pesados pueden ser de diversa naturaleza, siendo las más comunes [Domènech y Peral, 2006; Furini, 2012; Wasserman y col., 2013]:

- Actividades industriales. Destaca la industria metalúrgica, que emite metales en forma particulada, así como residuos sólidos con un alto contenido en Cr, Cu, Mn, Pb, Sb y Zn, mayoritariamente. Otras de las emisiones más relevantes se producen en la industria electrónica, la industria de recubrimientos metálicos y la

industria química. Estas industrias contribuyen a la emisión de elementos como As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pd, Pt, Ru, Sb, Sn y Zn.

- Agricultura y ganadería. Generan residuos derivados de la aplicación de fertilizantes a base de fosfatos y nitratos, y emiten metales como As, Cu y Zn, los cuales son añadidos junto a los alimentos para la explotación del ganado.
- Extracción de minerales. Constituye una importante fuente de emisión de metales, especialmente As, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn, tanto por su abundancia en las menas como en los subproductos de la explotación minera.
- Fundición. Consiste en el procesamiento del mineral hasta obtener el metal correspondiente. La contribución más preocupante es la emisión a la atmósfera de metales relativamente volátiles como As, Cd, Pb y Tl, los cuales pueden pasar a formar parte de la atmósfera en forma de materia particulada. Las actividades relacionadas con la minería, fundición y refinado, se basan en extraer los metales de sus menas, situadas en depósitos subterráneos, y posteriormente fundirlos y refinarlos hasta convertirlos en productos finales aptos para su utilización. Durante el transcurso de todas estas operaciones se liberan metales al medio, al igual que después de ser usados, ya que son desechados de forma no adecuada en numerosas ocasiones.
- Corrosión metálica. Los materiales metálicos expuestos a los agentes externos pueden liberar metales al medio cuando sufren el fenómeno de corrosión, como el Fe presente en materiales de construcción; Cu y Pb en cañerías; Cr, Co y Ni en aceros; Cd y Zn en recubrimientos de aceros; Cr y Pb en pinturas, etc.
- Gestión de residuos. Paradójicamente, se producen emisiones de metales bastante significativas (Cr, Cu, Mn, Ni, Pb y Zn) en operaciones como incineración de residuos urbanos, lixiviación de vertederos o eliminación de lodos de tratamientos de aguas residuales.
- Operaciones de dragado. Las operaciones de dragado constituyen una gran amenaza para los ecosistemas acuáticos. Los metales que forman parte de los sedimentos de los fondos marinos (en forma de sulfuros), sufren procesos de oxidación cuando son movilizados. Estos contaminantes pueden pasar a la columna de agua, y ser potencialmente peligrosos.
- Otras fuentes. Otras operaciones, como la quema de combustibles o las emisiones gaseosas procedentes de fábricas y vehículos, generan contribuciones importantes de estos elementos en la atmósfera. Estas concentraciones acabarán depositándose finalmente sobre la superficie terrestre, las aguas continentales y los océanos.

En la Tabla I.2 se muestran los elementos traza más importantes presentes en las aguas naturales, así como sus principales fuentes de emisión y los principales efectos perjudiciales que podrían causar sobre organismos y seres humanos. Algunos de estos metales traza son considerados como elementos esenciales cuando se encuentran a

niveles adecuados; no obstante, como se ha visto anteriormente, un exceso de estos contaminantes puede hacer que se conviertan en tóxicos y sean, por tanto, muy peligrosos para los organismos vivos.

Tabla I.2. Fuentes y efectos de los principales metales traza presentes en aguas naturales [http://www.epa.gov/safewater/contaminants/index.html; Orozco-Barreñte, 2008]

Elemento	Fuentes	Posibles efectos perjudiciales
Antimonio (Sb)	Efluentes de refinerías de petróleo, retardadores de fuego, cerámicas, esmaltes, productos electrónicos, tipografía, soldaduras	Tóxico. Aumento de colesterol en sangre y disminución de azúcar en sangre
Arsénico (As)	Medio geológico, pesticidas, residuos químicos, subproductos mineros, productos electrónicos	Tóxico, carcinogénico. Daños en la piel y en el sistema nervioso, trastornos circulatorios
Bario (Ba)	Medio geológico, efluentes de refinerías, pinturas	Tóxico. Aumento de presión arterial
Berilio (Be)	Efluentes de refinerías de metales, fábricas que emplean carbón, efluentes de industrias eléctricas, aeroespaciales y de defensa	Tóxico. Daño en pulmones, lesiones intestinales
Cadmio (Cd)	Medio geológico, efluentes de refinerías de metales, corrosión de tubos galvanizados, minería, líquidos de escorrentía de baterías usadas y de pinturas	Tóxico. Elevada presión en sangre, problemas renales, destrucción del tejido testicular. Acumulativo en hígado, riñón y páncreas
Cobalto (Co)	Medio geológico, metalurgia minería, pinturas, tintes	Esencial, forma parte de la vitamina B-12. Tóxico para plantas a pH ácido. En seres humanos tóxico, posiblemente carcinogénico. Efectos dañinos en pulmones, corazón, hígado
Cobre (Cu)	Medio geológico, recubrimientos metálicos, residuos industriales, electrodeposición, minería	Esencial. Tóxico para plantas y algas a niveles altos. En seres humanos, exposición a corto plazo: molestias gastrointestinales; a largo plazo: lesiones hepáticas o renales
Cromo (Cr)	Recubrimientos metálicos, curtido, efluentes de fábricas de acero y papel	Esencial como Cr(III), tóxico como Cr(VI). Daños en el sistema digestivo, riñón e hígado

Tabla I.2 (cont.). Fuentes y efectos de los principales metales traza presentes en aguas naturales [http://www.epa.gov/safewater/contaminants/index.html; Orozco-Barrene-txea, 2008]

Elemento	Fuentes	Posibles efectos perjudiciales
Hierro (Fe)	Medio geológico, corrosión, residuos industriales, aguas ácidas de minas, acción microbiana	Nutriente esencial, su deficiencia provoca anemia
Manganeso (Mn)	Medio geológico, drenajes, residuos industriales, aguas ácidas de mina, acción microbiana	Esencial, presenta baja toxicidad para animales. A altas concentraciones, produce daños en el sistema nervioso
Mercurio (Hg)	Medio geológico, minería, carbón y residuos industriales	Toxicidad tanto aguda como crónica, especialmente como compuestos organometálicos
Molibdeno (Mo)	Fuentes naturales, residuos de industrias.	Esencial para plantas, tóxico para animales en altas concentraciones
Níquel (Ni)	Recubrimiento de metales, aleaciones, baterías, pigmentos, catalizadores	Cancerígeno en altas dosis, produce dermatitis y náuseas
Plomo (Pb)	Medio geológico, combustibles, minería, residuos industriales, cañerías en el hogar	Tóxico, acumulativo. Produce inhibición de la síntesis de la hemoglobina. Afecta a los riñones y al sistema nervioso. En niños produce retardo en el desarrollo físico o mental
Cinc (Zn)	Residuos industriales, recubrimientos de metales, pigmentos, pinturas	Elemento esencial. A niveles superiores, tóxico para las plantas. En seres humanos puede causar calambres estomacales, náusea, vómitos, anemia
Talio (Tl)	Percolado de plantas procesadoras de minerales; efluentes de fábricas de vidrio, productos electrónicos y medicamentos	Caída del cabello, alteración de la sangre, trastornos renales, intestinales o hepáticos

De esta forma, los metales pesados son incorporados a las aguas naturales a través de fuentes de origen natural (medio geológico) o bien mediante fuentes antropogénicas (de forma directa o indirecta), con el riesgo de contaminación de los ecosistemas acuáticos; donde los organismos del medio cobran especial atención por la posible integración de éstos en la cadena trófica hasta llegar a los seres humanos.

1.3.4. Episodios destacados de contaminación por metales pesados

El daño que los metales pesados pueden causar sobre los ecosistemas y sobre la salud humana se ha ido poniendo de manifiesto a lo largo de la historia, mediante numerosos episodios de contaminación que han tenido lugar por intoxicación con estos contaminantes. A continuación se citan algunos de los desastres ecológicos más destacados:

➤ Contaminación por mercurio: Área de la Bahía de Minamata (Japón, 1932-1968)

A comienzos de los años 1950, se puso de manifiesto un envenenamiento masivo por metilmercurio (MeHg) en la población próxima a la Bahía de Minamata, una pequeña ensenada situada en la costa suroeste de la isla Kyushu. Las personas afectadas padecían una enfermedad neurológica severa, conocida como la *enfermedad de Minamata*. El origen de la contaminación estuvo en los vertidos realizados por una planta química productora de plásticos, donde el cloruro de metilmercurio era uno de los subproductos formados durante la producción de acetaldehído (producto de partida para la síntesis de plásticos, medicamentos y perfumes). Su vertido en el mar se concentró en peces, moluscos y crustáceos, que posteriormente fueron consumidos por personas. Con objeto de aumentar la producción, esta fábrica se expandió y se vertieron residuos también en el Río Minamata. De esta manera, la contaminación por metilmercurio llegó a alcanzar las aguas del Mar Shiranui. Los vertidos continuaron produciéndose hasta el año 1968 pero, dado que la mayoría de la población costera vivía y se alimentaba de la pesca, algunos habitantes pudieron estar expuestos a una contaminación crónica por MeHg durante más de 20 años. El metilmercurio es liposoluble y presenta una elevada toxicidad, puesto que puede atravesar fácilmente las membranas biológicas e incorporar el metal en la cadena trófica, afectando al sistema nervioso. Las personas afectadas por la llamada enfermedad de Minamata sufrían de ataxia, alteración sensorial en manos y pies, deterioro de los sentidos de la vista y el oído, debilidad y, en casos extremos, parálisis y muerte incluyendo teratogénesis (malformaciones anatómicas visibles) durante la gestación de bebés. Desde el brote inicial de la enfermedad de Minamata en 1953, el número de afectados había alcanzado la cifra de 2.264 en el año 2000 [Ekino y col., 2007; Yorifuji y col., 2009; Oyarzún y Oyarzun, 2011].

➤ Contaminación por cadmio: Área del río Jintsu (Toyama, Japón, 1947-1965)

Cientos de personas en esta región del Valle del río Jintsu en Japón, en particular los ancianos y las mujeres que habían tenido varios niños y habían tenido dietas pobres, contrajeron una enfermedad degenerativa de los huesos. Esta enfermedad se conoce con el nombre de "itai-itai" (cuya traducción significa "ay-ay"), denominada así

a causa de los fuertes dolores causados en las articulaciones. Años más tarde, en 1968, el Ministerio de Salud y Bienestar de Japón declaró que esta enfermedad había sido causada por un envenenamiento crónico por cadmio, el cual fue debido al consumo de arroz y pescado con altos contenidos en cadmio. La zona se caracterizaba por ser un área minera, donde se extraían minerales no ferrosos y tenían lugar procesos de fundición. Así, la causa fue una intoxicación por Cd procedente de los residuos mineros que eran directamente vertidos al río, cuyas aguas eran empleadas para regar los campos de arroz de la zona. La explicación ha sido que, en el organismo, los iones Ca(II) pueden ser reemplazados por los iones Cd(II) , por la similitud entre ambos en cuanto a carga y tamaño. El hecho de que las principales víctimas fuesen mujeres se explica por la deficiencia de calcio en todas ellas debido a periodos de lactancia, embarazos o menopausia [Baird y Cann, 2005; Shuto, 2005]. El envenenamiento por cadmio puede conllevar también a una disfunción tubular renal. En caso de contaminación crónica puede dar lugar a la denominada “anemia renal”.

Por ser el arroz una de las vías más probables de contaminación por Cd en Japón, el gobierno japonés ha establecido el valor de $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ como concentración segura, comprobándose así los niveles de Cd en este alimento antes de entrar al mercado. El problema radica en los agricultores que consumen su propio arroz sin control, en el que el nivel de cadmio se desconoce. Este hecho se ve agravado en el caso de áreas contaminadas por cadmio, donde puede existir un mayor riesgo de envenenamiento por este metal [Horiguchi y col., 2013].

➤ Contaminación por arsénico: Bangladesh, desde 1970

Este episodio es considerado, hasta la fecha, el mayor caso de envenenamiento de una población. Comenzó en Bangladesh, a principios de los años 60, donde millones de habitantes estuvieron expuestos durante dos décadas a niveles potencialmente tóxicos de arsénico en el agua potable [Asadullah y Chaudhury, 2011]. Todo esto fue el resultado de un programa bien intencionado, financiado, entre otros, por el Fondo para la Infancia y la Familia de Naciones Unidas (UNICEF) para instalar pozos poco profundos que proporcionaran una fuente de agua potable, libre de patógenos causantes de enfermedades. Ya en 1987, se observaron numerosos casos de lesiones epidérmicas inducidas por el arsénico, que se encontraba a altos niveles naturales en el agua extraída de los pozos [Ahuja, 2008].

Las especies inorgánicas de arsénico son tóxicas y se han encontrado en aguas subterráneas de diversas zonas del mundo a niveles superiores a los máximos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, WHO), cuyo límite es de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Sin embargo, el nivel máximo permitido para las aguas de Bangladesh y Bengala occidental (India) es de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. La ingesta de agua

contaminada por As durante largos periodos de tiempo, ha causado enfermedades como la “enfermedad del pie negro”, enfermedades vasculares, hipertensión, trastornos respiratorios, neurológicos y hepáticos, así como diversos tipos de cánceres, entre los que destacan el de vejiga y el de piel. La contaminación por As mediante las aguas subterráneas está considerada como una de las crisis de salud pública más peligrosas en Bangladesh. En torno a los 60-70 millones de personas han sido expuestas a una posible contaminación por As y varios miles de personas se han visto afectadas por arsenicosis crónica. Por ello, es de vital importancia estudiar los factores que controlan la movilización del arsénico (donde la materia orgánica disuelta puede ejercer un papel importante) así como el envenenamiento, para poder evaluar los posibles riesgos y proponer otras alternativas efectivas para la obtención de agua potable [Yunus y col., 2011; Flanagan y col., 2012; Tareq y col., 2013].

➤ Contaminación por metales pesados: estuario de Derwent (Tasmania, Australia, sobre 1970)

Otro episodio de contaminación por metales pesados se localizó sobre el año 1970 en el estuario de Derwent, el más grande ubicado en el sudeste de Tasmania (Australia). Afortunadamente este caso no afectó a la salud humana, sino que supuso fundamentalmente un problema de polución marina. Así, se encontraron altas concentraciones de metales como Hg, Zn, Cd, Pb, Cu y As en muestras de sedimentos y biota procedentes del estuario. El origen de esta situación fue la altísima contaminación de la zona, debido a la existencia de actividades antropogénicas, destacando los efluentes de industrias destinadas a la producción de papel, fertilizantes, construcción de buques y fundición de cinc, entre otros [Eustace, 1974; Coughanowr y Whitehead, 2013].

En relación al mercurio, aunque dicho estuario se encuentra sometido a descargas por parte de los ríos, la principal entrada este metal en el estuario provenía de vertidos industriales. Se encontraron concentraciones de hasta 16.000 ng L^{-1} en aguas y $1.100 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ en sedimentos próximos a una planta de refinería de cinc ubicada en la zona. Además, la presencia de elevadas concentraciones de mercurio en peces ha alarmado de forma especial sobre el nivel de contaminación del estuario. Al comparar este estuario con otros ecosistemas acuáticos contaminados de todo el mundo, se tomó conciencia de que el estuario de Derwent encabezaba la lista de las regiones más gravemente contaminadas en relación a su contenido en metales pesados. No obstante, se está trabajando desde hace algunos años en la mejora de la calidad de este estuario mediante medidas reparadoras y preventivas. Algunas de estas iniciativas incluyen un marco de seguimiento y supervisión en el que colabora el gobierno del estado, el gobierno local y las industrias implicadas, así como el programa denominado “Derwent Estuary Program” (DEP) o el plan de mejora de la calidad del agua “Water

Quality Improvement Plan”, con el objetivo de restaurar y proteger el estuario de Derwent, principalmente contaminado por metales pesados y otros compuestos peligrosos. Además, se ha fomentado la implantación y ejecución de una gestión de residuos más sensibilizada, provocando mejoras perceptibles del estado ambiental del estuario con el paso de los años [Plaschke y col, 1997; Coughanowr y Whitehead, 2013].

➤ Contaminación por metales pesados: Aznalcóllar (Sevilla, España, 1998)

Este accidente minero ocurrido en España, ha sido junto con el caso del buque “Prestige” (Galicia, 2002), uno de los casos de contaminación más importantes y con mayor repercusión en nuestro país en los últimos tiempos. Este desastre ecológico se produjo en el municipio de Aznalcóllar, por rotura de una balsa que contenía residuos procedentes del procesado de una mina de pirita. Estos residuos reunían tanto lodos con las fracciones no aprovechables dentro del proceso de obtención de pirita (ricos en metales pesados, sulfuros y arsénico), como aguas ácidas procedentes del lavado del mineral. La rotura de la balsa de almacenamiento de estos residuos ocasionó el vertido de un volumen aproximado de 5-6 millones de m³ de lodos y aguas ácidas [Álvarez-Ayuso y col., 2008]. Aunque el accidente no causó daños personales de forma directa, sí ocasionó un gran desastre ecológico y ambiental en la Cuenca del Guadiamar, con una gran repercusión sobre los cultivos, captaciones de agua y un alto riesgo para la fauna del Espacio natural de Doñana (considerado el santuario de aves más grande de Europa). La población de aves más afectada fue la de cigüeñas, de las que una proporción del 20% aproximadamente nació con deformidades en el pico [Garrido, 2008; Valtueña, 2002].

Los niveles de contaminación de las aguas de ambos ríos por metales pesados disminuyeron considerablemente los primeros 5 años posteriores al accidente, gracias a las labores de limpieza y el cese de la actividad minera. Sin embargo, todavía se encuentran altos niveles de metales pesados en el río Guadiamar, y en las aguas del acuífero del río Agrio. Debido a la lenta dinámica de las aguas subterráneas, se predice que la contaminación persistirá por muchos años, por lo que se deberían adoptar nuevas medidas para contribuir a la recuperación definitiva de estos ríos y sus ecosistemas. Además, los suelos siguen teniendo altas concentraciones de los elementos traza presentes en el lodo, si bien éstos se encuentran bastante inmovilizados en el suelo, en condiciones de baja biodisponibilidad [Tornero y col., 2011; Olías y col., 2012; Domínguez, 2012].

➤ Contaminación por metales pesados: *Baia Mare (Rumanía, 2000)*

Este desastre tuvo lugar en Baia Mare (Rumanía), en enero de 2000, por la ruptura de una balsa de decantación que almacenaba 20.000 toneladas de residuos de cinc y plomo procedentes de la mina de oro Aurul, entre los que el cianuro (120 toneladas) destacaba por su toxicidad. En total se vertieron 100.000 m³ de agua que contenía cianuro y otros contaminantes peligrosos en concentraciones muy superiores a las admisibles. El agua contaminada pasó al río Vaser y de éste a los ríos Tisza y Danubio, afectando de modo inmediato a Rumanía y, pocos días más tarde, a Hungría y Serbia. Quedó contaminada la flora y la fauna en unos 40 km de longitud del río Tisza, con la muerte de miles de peces. Durante varios días, las poblaciones ribereñas (aproximadamente 2,5 millones de personas) fueron abastecidas con agua transportada en cisternas, al no poder tomar agua de los ríos. En la desembocadura del Tisza en el Danubio, ya en territorio serbio, se detectó en el agua una concentración de cianuro 130 veces mayor que la máxima admitida por la Unión Europea (UE). Teniendo en cuenta los escasos medios de que disponían los países afectados, la UE prestó una ayuda masiva, calculada en varios centenares de miles de euros al principio de 2000. Ante la repetición en poco tiempo de dos sucesos similares (Aznalcóllar y Baia Mare) y dada la existencia de otras balsas mineras en España, Italia, Portugal y Suecia, la Comisión Europea procedió a establecer un inventario de los lugares de riesgo, con el fin de prevenir y evitar accidentes análogos [Valtueña, 2002; Sakan y col., 2009; Sakan y col., 2013].

➤ Contaminación por metales pesados: *mina de Kolontár (Hungría, 2010)*

Otra catástrofe ecológica sucedió en Hungría, en octubre del 2010, cuando la rotura de una balsa de la mina de aluminio de Kolontár, provocó el vertido de entre 600.000 y 700.000 m³ de lodo tóxico y corrosivo, residuo de la producción de aluminio, que contenía grandes cantidades de minerales y óxidos, como hematita, goetita, bohemita, cuarzo, aluminosilicatos de sodio, dióxido de titanio, carbonato/aluminato de calcio y óxido de magnesio, y metales pesados. Además, el pH del barro era muy básico (9-12,5), puesto que contenía grandes cantidades de NaOH utilizado en el proceso Bayer para extraer aluminio de la bauxita. El lodo contaminado penetró en las riberas de los afluentes del Danubio y el polvo afectó a los pulmones de cientos de ciudadanos de la región, que aún hoy sufren sus efectos. La catástrofe dejó diez muertos, cientos de heridos y contaminó gravemente más de 40 km² de zonas destinadas a la agricultura [Ruyters y col., 2011; Mayes y col., 2011; Winkler, 2013].

1.3.5. Distribución de los metales pesados en los ecosistemas acuáticos

Aunque es el agua el elemento principal y más característico de los ecosistemas acuáticos, deben considerarse otros dos compartimentos fundamentales, como las materias sólidas (partículas en suspensión y fondos marinos sedimentarios y rocosos) y la biota (flora y fauna). En estos compartimentos, constantemente tienen lugar interacciones mediante procesos físicos, químicos, geológicos y biológicos, basados fundamentalmente en fenómenos de transporte de masa y transferencia de energía, de forma que se encuentran interrelacionados entre sí [Bhakta y Munekage, 2008]. Todas estas interacciones y procesos pueden provocar cambios en la composición química de los distintos compartimentos, ya sea a escala local o global. En la Figura I.4 se muestran las principales vías de transferencia de los metales pesados entre sedimentos, materia en suspensión, biota y columna de agua, en el seno de un determinado ecosistema acuático. Así, los metales pesados pueden transferirse de un compartimento a otro mediante distintos procesos. Los metales disueltos en el agua pueden pasar a formar parte de la materia en suspensión o sedimentos del fondo marino a través de procesos de adsorción, intercambio iónico y/o complejación (**vía a**). Del mismo modo, los metales que forman parte de los sedimentos y la materia en suspensión, pueden volver a la columna de agua mediante desorción (**vía b**). Por otra parte, la materia suspendida puede sufrir procesos de floculación y/o precipitación y acabar depositándose como sedimento sobre el fondo marino (**vía c**), pudiendo volver a formar parte de la materia en suspensión por resuspensión del sedimento (**vía d**). Los metales disueltos pueden interactuar con la biota acuática y ser asimilados por ellos mediante ingestión y/o adsorción (**vía e**), o liberados de ellos por excreción y/o desorción (**vía f**). Por último, los metales que forman parte de los sedimentos y materia suspendida pueden entrar en contacto con la biota por ingestión (**vía g**), pudiendo volver al sedimento marino o materia suspendida por deposición y/o descomposición de la biota (**vía h**) [Domínguez-Lledó, 2006].

Aunque numerosos factores pueden alterar la concentración y distribución natural de los metales pesados en el agua de mar, las modificaciones más importantes tienen lugar sobre todo en aquellas zonas que pueden considerarse interfases naturales con el medio marino: líquido-líquido (zonas de estuarios), sólido-líquido (zonas costeras, fondo marino), gas-líquido (atmósfera-mar). Así, son de destacar las interacciones de este medio con la hidrosfera (aportes fluviales), con la litosfera (aportes por meteorización y lixiviación de rocas,...) y con la atmósfera (intercambio de gases, deposición de partículas atmosféricas,...). También han de tenerse en cuenta factores que pueden modificar su concentración y distribución, como son los movimientos de las masas de agua, en sentido vertical (circulación vertical) y en sentido horizontal (corrientes marinas), así como las causas de origen biológico.

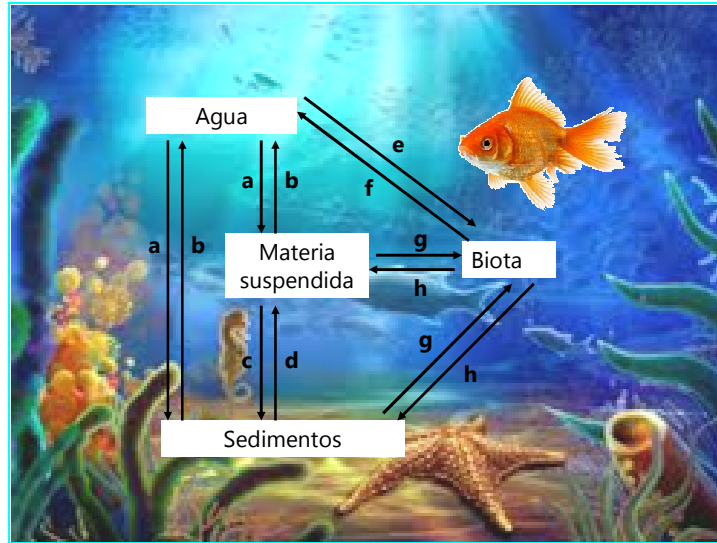


Figura I.4. Principales procesos de transferencia de metales pesados entre los diferentes compartimentos del medio acuático: **a)** Adsorción, intercambio iónico y/o complejación; **b)** Desorción; **c)** Floculación y/o precipitación; **d)** Resuspensión; **e)** Ingestión y/o adsorción; **f)** Excreción y/o desorción; **g)** Ingestión; **h)** Descomposición y/o deposición (Figura modificada de Casas, 1990)

Como es sabido, los metales pesados son contaminantes persistentes, es decir, no pueden ser creados ni degradados por procesos biológicos o antropogénicos. Una vez que han entrado en los ecosistemas acuáticos, se transforman a través de procesos biogeoquímicos y se distribuyen entre varias especies con distintas características físico-químicas, como pueden ser material particulado ($>0,45 \mu\text{m}$), coloidal ($0,45 \mu\text{m} - 1 \text{ nm}$) y especies disueltas ($\leq 1 \text{ nm}$). En estas últimas especies se incluyen los iones metálicos hidratados, los cuales suelen ser considerados como la fracción metálica más biodisponible, así como los complejos metálicos orgánicos e inorgánicos con ligandos de origen natural o antropogénico, los cuales son potencialmente biodisponibles, en mayor o menor medida [Tercier-Waeber y Taillefert, 2008].

La concentración de metales en la columna de agua es generalmente pequeña debido a la baja solubilidad de estos elementos. Debido a los procesos de adsorción, hidrólisis y co-precipitación, los metales tienden a acumularse en los sedimentos [Hou y col., 2013] y en los organismos acuáticos, alcanzándose niveles importantes, con factores de concentración de entre 10^3 y 10^5 respecto a la fase disuelta. Es por ello que los sedimentos se consideran sumideros y, por tanto, reservorios de metales pesados

en el medio acuático. La afinidad de los metales por la materia particulada y la deposición de dichas partículas sobre el fondo contribuyen en gran medida a este fenómeno. No obstante, en los estudios de distribución de metales pesados en los ecosistemas acuáticos se da especial énfasis a los metales que se encuentran en fase disuelta en el agua, que se define convencionalmente por aquella fracción que pasa a través de filtros de 0,45 μm de tamaño de poro, por considerarse la fracción más biodisponible y peligrosa, que podría denominarse "fracción filtrable", y que en el caso de los metales incluiría el metal coloidal y las especies disueltas inferiores a 1 nm [Batley y col., 2004]. En general, el contenido total en metales pesados presentes en las aguas suele expresarse como la contribución del contenido presente en la fase disuelta y el asociado a la materia particulada.

Es de destacar que las zonas costeras, zonas de estuarios y ríos suelen contener mayor concentración de metales pesados que el agua de mar oceánica, sobre todo si el río está sujeto a procesos de polución antropogénica. Así, los ríos, junto con estos aportes derivados de actividades antropogénicas y otros aportes naturales en las áreas costeras, determinan un gradiente de concentración de metales que disminuye a medida que aumenta la distancia respecto a la costa.

En la Tabla I.3 se comparan intervalos típicos mínimos y máximos de concentraciones de metales en distintas muestras acuosas naturales: aguas de río, aguas costeras, bahías y estuarios, y aguas oceánicas [Crompton, 2007]. Estos datos deben ser considerados únicamente como orientativos, aunque pueden ofrecer una visión general para situar los ecosistemas acuáticos que se estudian dentro de los patrones habituales con que estos metales suelen presentarse en sistemas semejantes.

No obstante, las concentraciones más altas de metales pesados se encuentran en los sedimentos y biota. En el seno del medio acuático, los metales enlazan fácilmente con el material particulado o sedimentos, y en esta forma son relativamente no-tóxicos, pero cambios en el tiempo o en las condiciones del medio u otros factores medioambientales pueden provocar la movilización de los mismos, aumentando su disponibilidad y toxicidad [Berkowitz, 2008; Namiesnik y Szefer 2010].

Tabla I.3. Intervalos de concentraciones metálicas encontradas en diferentes aguas naturales [Crompton, 2007]

Metal	Agua de río ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Agua de estuario, bahía y costa ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Agua de mar oceánica (superficial) ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Al	73,0-6300	6,4-63,0	0,10-0,60
As	0,42-490,0	1,0-1,04	-
Cd	0,03-5,0	0,015-5,0	0,01-0,13
Co	0,2-10,0	0,01-0,25	0,003-0,16
Cr	0,05-23,0	0,095-3,30	0,005-1,26
Cu	0,11-200,0	0,07-20,0	0,0063-2,80
Fe	1-3.925	1-250	0,2-322
Hg	0,009-1,30	$2 \cdot 10^{-5}$ -15,1	0,002-0,078
Mn	0,97-1.835	0,35-250	0,018
Mo	0,74-4,10	2,1-200,0	3,20-12,0
Ni	1,5-4,4	0,20-5,3	0,15-0,93
Pb	0,13-60,0	0,04-7,44	$4 \cdot 10^{-5}$ -9,00
V	0,1-24	0,01-5,1	0,45-2,00
Zn	0,86-630,0	0,007-200,0	0,05-10,90

I.3.5.1. Procesos de disminución de la concentración de metales pesados en el medio acuático

Como se ha comentado, la concentración de un metal determinado en el agua es baja en comparación con la que se puede encontrar en los sedimentos. La afinidad de los metales por la materia particulada y coloidal, tanto orgánica como inorgánica, es la clave de este suceso. Es por ello, que los sedimentos se consideran los principales sumideros de este tipo de contaminantes. Asimismo, los metales tienden a ser asimilados por la biota, disminuyendo también la concentración de los mismos en el medio acuático. No obstante, estos fenómenos pueden presentar un carácter reversible, de forma que estos contaminantes pueden volver al seno del medio acuático mediante desorción, disolución o procesos biológicos [Greenaway y Rankine-Jones, 1992], como ya se mostró en la Figura I.4. A continuación se describen estos procesos detalladamente:

- **Procesos de adsorción de metales pesados**

La principal causa de este proceso es la carga negativa neta que posee la mayor parte de la materia particulada en los ecosistemas acuáticos (arcillas, óxidos hidratados metálicos y materia orgánica particulada), así como su carácter coloidal.

Esto hace que los cationes metálicos sean electrostáticamente atraídos hacia la superficie de estas partículas. Algunas de ellas, al enriquecerse de metales pesados, incrementan su masa, por lo que terminan depositándose en el fondo. El grado en el que tiene lugar este fenómeno depende, entre otros factores, de la naturaleza del metal, la abundancia de materia particulada, la concentración de otros solutos y la profundidad de la columna de agua [Förstner y Wittmann, 1983].

- **Procesos de precipitación**

En las aguas naturales se pueden encontrar altas concentraciones de aniones que interaccionan con los metales pesados que se encuentran en ellas. Aunque, en general, las formas químicas de los metales pesados asociados a estas especies son bastante solubles, las características del agua natural pueden producir la precipitación de éstas bajo determinadas condiciones. Los procesos de floculación y precipitación se encuentran favorecidos por un aumento en factores como pH, turbulencia, concentración de materia suspendida y fuerza iónica, entre otros [Karbassi y col., 2008]. Por ejemplo, en el caso de los hidróxidos, esta solubilidad disminuye con el aumento del pH, lo que puede producir la precipitación de estos compuestos en condiciones básicas. Por otro lado, los sulfuros de los metales pesados son prácticamente insolubles al pH de las aguas naturales, mientras que la solubilidad de los carbonatos es altamente dependiente de la presión parcial de CO_2 , aumentando en su presencia [Förstner y Witmann, 1983]. En el caso particular de las zonas de estuario se ha detectado la disminución de la concentración de metales procedentes del aporte fluvial; que se origina, entre otras razones, por la aparición de fenómenos de precipitación fundamentalmente debidos a los cambios de pH y fuerza iónica que tienen lugar en las zonas de mezcla de aguas dulces y marinas. Igualmente, en las aguas porosas e intersticiales de los sedimentos, bajo condiciones anóxicas generadas por la oxidación de la materia orgánica particulada, ciertas bacterias reducen el sulfato a sulfuro, el cual puede formar con los metales pesados sulfuros metálicos, que presentan muy baja solubilidad, favoreciendo la precipitación y coprecipitación [Greenaway y Rankine-Jones, 1992].

- **Incorporación a la biota**

Los organismos vivos también influyen en el contenido y distribución de los metales pesados en los ecosistemas acuáticos [Vasconcelos y col., 2002; Öztürk y col., 2003]. Los organismos tienen mecanismos bien desarrollados para absorber, metabolizar y excretar diferentes elementos, incluso metales en concentraciones que se encuentran de forma natural. En este sentido, por ejemplo, el fitoplancton incorpora metales pesados para emplearlos en determinados sistemas enzimáticos

que catalizan procesos como la glicólisis, el ciclo del ácido tricarboxílico, la fotosíntesis y el metabolismo de las proteínas; y el zooplancton y la fauna bentónica, que se alimentan por filtración, acumulan metales pesados presentes en los sedimentos [Bruland, 1983]. Son los bivalvos, en concreto las almejas o mejillones una de las especies más empleadas como indicadores biológicos de contaminantes orgánicos o inorgánicos, incluidos los metales pesados [Belabed y col., 2013].

1.3.5.2. Los sedimentos como principales sumideros de metales pesados

Los sedimentos se comportan como aceptores finales de contaminantes, ya que mediante los procesos de adsorción y precipitación (expuestos en el apartado anterior) los metales tienden a depositarse sobre la materia suspendida y fondos marinos. Es por ello que los sedimentos son considerados los principales sumideros o reservorios de metales pesados en los ecosistemas acuáticos. Por este motivo, los estudios sobre la distribución de metales pesados en sedimentos cercanos a zonas pobladas o industrializadas, pueden proporcionar datos necesarios que evidencien la existencia de contaminación antropogénica sobre los ecosistemas y ayudar así en la evaluación de los riesgos asociados a este tipo de contaminación [Alonso-Castillo y col., 2013].

Los metales pesados pueden llegar a estar asociados con los sedimentos de varias formas: ocluidos en materiales amorfos, adsorbidos sobre superficies de arcillas u oxi-hidróxidos de Fe/Mn, formando parte de la estructura de minerales secundarios como carbonatos, sulfatos u óxidos, o de minerales primarios como los silicatos; o formando complejos asociados a la materia orgánica [Peng y col., 2009]. Los procesos más importantes son la adsorción química de metales pesados sobre oxi-hidróxidos de Fe/Mn, materia orgánica y arcillas. Los carbonatos también son materiales importantes en los sedimentos, a los cuales puede estar asociada una fracción importante del metal.

Los materiales orgánicos en los sedimentos tienen un papel destacado, ya que participan en la solubilización del metal al formar complejos de iones metálicos, a la vez que, dependiendo de su naturaleza, pueden producir el efecto contrario. Por ejemplo, ciertas sustancias húmicas de elevado peso molecular contienen grupos orgánicos tales como polisacáridos, proteínas y fenoles, los cuales pueden complejar iones metálicos fácilmente, originando complejos insolubles (a causa de su tamaño), de manera que los metales quedan retenidos en el sedimento. Otra vía de entrada de los metales en los sedimentos es mediante la descomposición y deposición de organismos muertos, los cuales llevan consigo metales, bien tomados por el organismo mientras vivía, o bien adsorbidos sobre ellos antes o después de su muerte, llegando a ser incorporados de esta manera a los sedimentos [Morell y Hernández, 2000].

Así, en sedimentos aerobios, la presencia de hidróxidos de hierro, manganeso, aluminio y carbono orgánico tienden a disminuir la biodisponibilidad de los metales en el medio [Camilión y col., 2003]. Los sedimentos suelen estar expuestos a condiciones aerobias en la capa más externa, la que se encuentra en contacto con el agua, con altas concentraciones en oxi-hidróxidos de hierro y manganeso, los cuales tienden a enlazarse con los metales pesados. Además, se han encontrado correlaciones negativas entre el contenido de carbono orgánico en el sedimento, los efectos tóxicos y la bioacumulación de metales en organismos expuestos. Por tanto, altas concentraciones de carbono orgánico producen una disminución en la concentración de metal libre y biodisponible para los organismos. [Besser y col., 2003; Gorski y col., 2008]. Por otro lado, el valor del pH y el potencial redox del medio juegan un papel muy importante en las asociaciones de los metales con los oxi-hidróxidos. Así, a valores bajos de pH, los metales son desplazados de los oxi-hidróxidos por los iones hidrógeno [Triverdi y Axe, 2000].

En sedimentos anóxicos, la biodisponibilidad de algunos metales (cadmio, cromo, plomo y cinc) estaría regulada por la concentración de sulfuros. En general, los metales pesados no suelen ser solubles bajo determinadas condiciones reductoras en los sedimentos, por lo que se adsorben fácilmente sobre ellos. Según la fuerza de cohesión o adsorción de los metales pesados sobre los sedimentos, se han descrito las siguientes tendencias: $Hg > Cu > Pb > Zn$ [Sierra, 1993], o $Cr > Cu > Co > Ni > Mn > Zn > Cd$ [Casas y col., 1990], siendo los metales como Hg, Cr o Cu mucho más estables que por ejemplo el Cd. Como consecuencia de este hecho, los niveles de metales disueltos en el agua intersticial se mantienen bajos, disminuyendo así su disponibilidad. No obstante, estas condiciones pueden cambiar, por ejemplo, cuando estos sedimentos se ponen en contacto con agua rica en oxígeno.

En la Tabla I.4 se pueden observar los intervalos típicos (mínimo/máximo) de concentración de los metales pesados de mayor interés medioambiental en muestras de sedimentos. Al igual que se indicó en las concentraciones correspondientes a los niveles de metales pesados en agua (Tabla I.3), se trata de datos orientativos, los cuales permiten conocer cuáles son las concentraciones usuales en cada caso. En comparación con los valores en aguas, las concentraciones de metales pesados en sedimentos pueden exceder a los primeros en algunos órdenes de magnitud. Se vuelve a confirmar la afinidad de éstos por asociarse con los compuestos que forman parte de los sedimentos.

La evaluación de la concentración de metales en sedimentos marinos es una forma efectiva de medir el grado de contaminación por metales de una determinada área o ecosistema acuático, sobre todo en zonas costeras y de estuario, las cuales están sujetas a una mayor contaminación de procedencia antropogénica. De forma general,

el grado de contaminación que haya sufrido un ecosistema en un momento concreto, puede verse reflejado tiempo después en el análisis de muestras de sedimentos de dicho ecosistema, ya que la deposición final de éstos en el fondo marino implica cierto tiempo [Yuan y col., 2012; Zhang y col., 2013a].

Por tanto, es más frecuente encontrar un mayor número de trabajos científicos dedicados al estudio de la evaluación del contenido metálico en sedimentos procedentes de estuarios, bahías y zonas costeras que en aguas abiertas (mares y océanos).

Tabla I.4. Intervalos de concentración encontrados en la bibliografía para diversos metales en sedimentos de río, de estuario, bahía y costa, y oceánicos

Metal	Sedimento de río⁽¹⁾ (mg kg⁻¹)	Sedimento de estuario, bahía y costa⁽²⁾ (mg kg⁻¹)	Sedimento oceánico⁽³⁾ (mg kg⁻¹)
Al	12.100-95.100	24.500-96.000	12.500-77.900
Ag	0,05-3,70	0,43-6,96	0,12-0,18
As	1,3-81,8	4,7-72,6	4,2-43,7
Ba	58,9-488,0	150-1.800	428-758
Cd	0,01-6,50	0,01-25,20	0,05-1,54
Co	0,6-94,5	7,1-103,0	-
Cr	1,6-212,0	35,7-2.700	12-140
Cu	0,7-163,0	3,7-197,0	2,8-85,0
Fe	11.600-69.700	19.100-92.600	2.300-52.100
Hg	0,001-4,430	0,015-1,890	0,005-0,181
Mn	111-1.350	246,6-1.700	46-1.910
Mo	0,10-3,80	0,3-5,2	-
Ni	0,70-85,0	18,0-304,0	3,4-79,0
Pb	1,3-127,0	14,1-1.700	5,8-62,0
V	25,5-146,0	51-282	20-163
Zn	4,0-530,0	34,2-5.300	10-244

Tabla elaborada a partir de las siguientes referencias bibliográficas:

- ⁽¹⁾ Doong y col., 2008; Davutluoglu y col., 2011; Lanceleur y col., 2011; Song y col., 2011; Šajn y col., 2011; Zhang y col., 2011; Wang y col., 2012a
⁽²⁾ Alagarsamy, 2006; Marmolejo-Rodríguez y col., 2007; Delgado y col., 2010; Feng y col., 2011; Abdallah, 2012; Woods y col., 2012; Zhao y col., 2012; Hu y col., 2013a
⁽³⁾ Heimbürger y col., 2012; Yuan y col., 2012; Trefry y col., 2013

1.3.5.3. Removilización y redistribución de metales pesados desde sedimentos

Ya se ha mencionado que los sedimentos se comportan como aceptores finales de contaminantes, ya que mediante los procesos de adsorción y precipitación los metales tienden a depositarse sobre la materia suspendida y fondos marinos. Paradójicamente, pueden comportarse como nuevas fuentes no puntuales de contaminación [Burton, 2002]. Ello se debe a que los metales pueden ser removilizados o resuspendidos de forma natural, mediante cambios en factores químicos (tales como pH, potencial redox, especiación química, etc.) o biológicos [Zhu y col., 2012]. Por otra parte, los contaminantes asociados a los sedimentos pueden ser removilizados a causa de la actividad humana, como frecuentemente ocurre tras los procesos de dragado [Sprovieri y col., 2007]. Así, estos mecanismos generan la removilización y redistribución de los contaminantes desde los sedimentos a la columna de agua.

➤ Removilización natural de metales pesados en sedimentos

Existen determinados parámetros físico-químicos y biológicos en las aguas, cuyos cambios o variaciones pueden provocar procesos de removilización de estos contaminantes. A continuación se describen los más influyentes [Eggleton y Thomas, 2004]:

- **Salinidad.** Un aumento de la salinidad de las aguas implica un aumento de la concentración de iones en el medio. Cuando esto ocurre, los metales pesados adsorbidos en los sedimentos de ríos o estuarios pueden sufrir procesos de movilización mediante la formación de complejos solubles clorados, como es el caso particular del Cd, donde el complejo CdCl_2 es bastante estable en comparación con su capacidad de adsorción sobre el sedimento. Además de la formación de complejos estables, cationes como Na, K, Ca y Mg pueden competir con los metales pesados por los sitios o puntos de adsorción del material particulado. Se ha encontrado un aumento en la solubilidad de elementos como Cd, Cr y Cu como consecuencia de un aumento en la salinidad, mientras que éste no es especialmente significativo con respecto a la movilidad del Ni o Pb [Tam y Wong, 2000; Du Laing y col., 2009]. De esta forma, los metales que forman parte del sedimento podrían ser reemplazados por otros cationes y abandonarían la fase sólida para volver a formar parte de la columna de agua, convirtiéndose así en sustancias más biodisponibles [Zhao y col., 2013a].
- **Acidez.** Se ha comprobado que el valor del pH del medio influye en la solubilidad de los metales liberados desde los sedimentos. Cuando el pH disminuye, es decir, aumenta la acidez del medio, los hidróxidos tienden a solubilizarse y los cationes metálicos liberados al medio aumentan su movilidad.

Esto se ha observado en el caso de elementos como cinc, cadmio, mercurio y cobalto [Förstner y col., 1990; Plant y Raiswell, 1983; Du Laing y col., 2009; Zhao y col., 2013a].

- **Procesos de oxidación/reducción.** Estos procesos, así como las variaciones del pH del medio, son los que ejercen una mayor influencia en los fenómenos de liberación de metales desde la matriz de los sedimentos. Cuando en el medio se producen cambios de condiciones reductoras a oxidantes, determinados sulfuros insolubles pasan a otras formas y los metales pueden liberarse al medio (como por ejemplo en el caso de metales como Hg, Zn, Pb, Cu y Cd). Aunque no siempre es así, pues bajo estas mismas condiciones oxidantes, la movilidad para el Mn y Fe es baja, ya que tienden a formar óxidos e hidróxidos bastante estables [Förstner, 1993], los cuales actúan como importantes sitios de unión para metales cuando los sedimentos se encuentran en condiciones óxicas [Fan y col., 2002].
- **Agentes complejantes/quelatantes.** La presencia de este tipo de compuestos en el seno del medio acuático puede provocar la removilización de los metales pesados desde los sedimentos a la columna de agua, en tanto en cuanto éstos tiendan a formar complejos o quelatos con dichos compuestos. El grado de movilización de los metales va a depender de la concentración del agente complejante, valor de pH, afinidad por estos compuestos y competitividad con otros cationes.
- **Actividad microbiológica.** Determinadas bacterias o microorganismos intervienen en el proceso de movilización de trazas metálicas por formación de compuestos orgánicos capaces de complejar a estos iones metálicos, modificando propiedades físico-químicas del medio y catalizando procesos de oxidación/reducción [Craig, 1986].
- **Vientos, corrientes y mareas.** Otros agentes que pueden influir en los procesos de resuspensión de metales pesados son los vientos, corrientes y mareas. Éstos pueden favorecer el movimiento de los sedimentos marinos así como la liberación de algunos metales. En el caso de sedimentos expuestos a condiciones anaerobias, estos movimientos pueden provocar una oxigenación de la zona y con ella, la oxidación de determinadas sustancias. De esta forma, podrían darse procesos de removilización y liberación de los metales a la columna de agua. Un ejemplo sería el caso de sedimentos ricos en sulfuros, los cuales al pasar de condiciones reductoras a oxidantes, podrían sufrir procesos de movilización y redisolución de ciertos metales que previamente formaban parte de sulfuros insolubles [Roberts, 2012].

En relación a estos parámetros anteriores, se consideran los estuarios como zonas de especial interés, ya que son zonas de mezcla donde confluyen agua dulce y marina, donde se producen cambios drásticos en parámetros fisicoquímicos como pH, salinidad, etc., que además están bajo la influencia de corrientes y mareas.

➤ **Removilización de metales pesados en sedimentos debido a procesos de dragado**

Otra causa de la removilización de metales pesados en sedimentos puede ser las operaciones de dragado. Esta actividad, realizada por el hombre, tiene como fin la extracción de sedimentos en cursos de agua, lagos, bahías o accesos a puertos, para aumentar la profundidad de un canal navegable o de un río con el fin de aumentar la capacidad de transporte de agua, evitando así las inundaciones aguas arriba. De esta manera, se pretende con ello aumentar el calado de estas zonas para facilitar el tráfico marítimo por ellas sin perjuicio para los buques, evitando el riesgo de encallamiento [Lors y col., 2004].

Los sedimentos presentes en el fondo marino se dividen por lo general en dos zonas: una zona más superficial que se encuentra en contacto con el agua, la cual contiene oxígeno (capa óxica), y otra más profunda (aproximadamente a partir de 2 cm de profundidad), la cual no dispone de apenas oxígeno (capa anóxica) [Salomons y Baccini, 1989]. Como es de esperar, ambas capas difieren en su composición. La más interna suele tener altas concentraciones de carbonatos y sulfuros y un menor contenido en hidróxidos de hierro y manganeso.

Las operaciones de dragado producen una resuspensión de la capa anóxica de los sedimentos, los cuales son ricos en sulfuros. Numerosos metales (Zn, Cd, Pb, Cu, Ag, Hg) se encuentran asociados a ellos, formando sulfuros insolubles. Cuando las partículas de sedimento se ponen en contacto con el agua, estas nuevas condiciones óxicas producen la oxidación de los sulfuros a sulfatos, y con ello la liberación y movilidad de los metales pesados a la columna de agua. Además, la reacción de oxidación de sulfuro a sulfato libera protones, por lo que disminuye el pH del medio lo cual favorece aún más la movilidad de algunos metales. Los metales adsorbidos o co-precipitados con FeS y MnS se oxidan rápidamente, dada la relativa solubilidad de estos compuestos en condiciones óxicas. Sin embargo, los enlaces metal-sulfuro más estables tienen menor tendencia a oxidarse por la lenta cinética del proceso. Tras la oxidación de los sulfuros, tanto el Fe como el Mn liberados pueden re-precipitar y depositarse rápidamente en forma de óxidos/hidróxidos insolubles, y los metales en el medio pueden volver a adsorberse en mayor o menor grado [Du Laing y col., 2009].

La granulometría o tamaño de grano de los sedimentos tiene una influencia muy importante sobre la capacidad de retención de los metales. Los metales pesados presentes en ecosistemas acuáticos muestran una alta afinidad por las partículas finas de sedimento [Salomon y Förstner, 1984; Lin y col., 2003], observándose una fuerte correlación positiva entre la disminución del tamaño de grano y la concentración de varios metales [Horowitz, 1986]. Esta correlación se debe tanto a factores físicos como mineralógicos (composicionales). Las partículas de arcillas ($<2\ \mu\text{m}$) poseen una elevada área específica, determinando reacciones de superficie que favorecen las interacciones de metales con el sedimento. Como consecuencia, los sedimentos de grano fino son importantes sumideros de algunos constituyentes inorgánicos. Además del tamaño de grano, hay que tener en cuenta la composición de las partículas, ya que los metales tienden a formar complejos con carbonatos o aluminosilicatos, adsorberse sobre óxidos de hierro y manganeso, o formar complejos orgánicos con la materia orgánica [Yoo y col., 2013]. Además las partículas finas, ligeras y de pequeño tamaño, serán más susceptibles de ser resuspendidas y la superficie de contacto entre éstas y el agua así como los tiempos de resuspensión serán mayores. Esta resuspensión favorece los procesos de liberación de metales. Sin embargo, no todos los metales tienden a acumularse en la fracción fina del sedimento. Los autores Chakrapani y Subramanian (1993) encontraron que metales como Cu, Zn, Mn y Fe aumentaban su concentración con las fracciones más finas, al contrario que el Cr, el cual mostraba menor concentración en las partículas más finas, mientras que el Pb mantenía una concentración constante en función del tamaño de grano [Chakrapani y Subramanian, 1993].

Como se ha ido vislumbrando a lo largo de este apartado relacionado con la removilización y redistribución de los metales pesados presentes en los sedimentos, no resulta igual de peligroso o biodisponible un metal que se encuentra relativamente "inmovilizado" formando parte de un compuesto insoluble en los sedimentos (por ejemplo sulfuros), que aquel que se encuentra formando parte de un compuesto soluble en la columna de agua. El segundo será más biodisponible para la biota acuática que habita en el ecosistema. Se ha demostrado que los metales lábiles (aquellos fácilmente extraíbles mediante MgCl_2 , ácido acético o HCl diluido) se encuentran más biodisponibles para la biota, mientras que los metales asociados a los óxidos de Fe y Mn son menos biodisponibles para los organismos acuáticos [Wang y col., 2010a]. Uno de los efectos más graves de la removilización de estos metales es que sean ingeridos/adsorbidos por la biota acuática, sobre todo por organismos que ocupan el último eslabón en la cadena trófica y que la toxicidad se vea agravada por mecanismos de bioacumulación y biomagnificación. Estos organismos pueden ser consumidos por los seres humanos, pudiendo resultar gravemente perjudiciales para la salud [Roberts, 2012].

Por tanto, la toxicidad de un determinado metal no va a depender únicamente de su concentración total en el ecosistema acuático, sino que estará altamente influenciada por la forma química en que se halle (en forma disuelta, formando complejos solubles o como precipitado) y también dependerá mucho de las condiciones del medio y de su variabilidad. Son numerosos los factores que influyen en la forma química que presenta un determinado metal (pH, potencial redox, tipo de suelo y sedimento, dureza del agua, composición, contenido orgánico, entre otros). Estos factores pueden variar con relativa facilidad en un mismo ecosistema o de un medio a otro. No todas las formas de un metal son igualmente disponibles y, en consecuencia, tóxicas; por ello es necesario estudiar en qué formas se encuentran los distintos metales en un ecosistema y sus contenidos correspondientes, es decir, su *especiación química* [Alonso y col., 2004; Sundaray y col., 2011; Alonso-Castillo, 2013].

1.3.6. Biodisponibilidad y toxicidad de metales pesados en ecosistemas acuáticos: introducción a la especiación química

La biodisponibilidad de un determinado elemento puede entenderse como el grado de accesibilidad del mismo respecto a los organismos vivos. Esta característica, aunque se encuentra directamente relacionada con la toxicidad que presenta un determinado contaminante, no es la única que determina la peligrosidad de una determinada sustancia en un ecosistema acuático. En la Figura I.5, se muestran los principales factores (del propio metal, del medio en el que se encuentra, o del organismo en cuestión) que influyen sobre el concepto global de toxicidad.

Uno de los destinos finales de los metales pesados puede ser los organismos vivos presentes en los ecosistemas. Los metales, una vez han penetrado en el organismo en cuestión, actúan sobre éste no sólo en función de su concentración y de su forma química, sino que influyen los otros factores (Figura I.5), como la familia y especie, sexo, edad, estrés, mecanismos de regulación, etc. El tiempo de exposición al contaminante (contaminación aguda o crónica) también constituye un parámetro muy importante a la hora de evaluar el grado de accesibilidad y evaluar sus posibles efectos. Por lo tanto, distintos organismos expuestos a unas mismas condiciones de contaminación no darán una misma respuesta toxicológica. Además, hay que tener en cuenta los fenómenos de bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación, característicos de estas sustancias.



Figura I.5. Esquema global de los factores que influyen en la toxicidad de los metales pesados sobre los organismos presentes en los ecosistemas acuáticos [Libes, 1992; Gupta y col., 2007]

Es frecuente evaluar la posible toxicidad de un determinado metal frente a una especie concreta mediante la realización de ensayos de toxicidad. Las especies más estudiadas del medio acuático suelen ser bacterias, algas, invertebrados y peces. Por lo general, se parte de organismos aún no contaminados los cuales se someten, bajo condiciones estándares, a una exposición de distintas concentraciones del metal en cuestión. Una vez transcurrido el tiempo establecido para un determinado ensayo, se observan y estudian los efectos producidos sobre los organismos expuestos. A partir de toda esta información extraída, se definen unos índices que permiten una estimación de la evaluación ecológica de los efectos y el alcance de estos contaminantes tóxicos en función de su concentración. Mediante estos estudios de toxicidad, se pueden establecer límites-guía de exposición a los distintos contaminantes. Estos estudios también pueden realizarse para evaluar el impacto de mezclas sobre las comunidades de los ambientes que las reciben, así como comparar la sensibilidad de una o más especies a distintos tóxicos o a diferentes condiciones para

el mismo tóxico [Geffard y col., 2003; Crompton, 2007; Xu y col., 2011a; Balistrieri y Mebane, 2014].

En las Tablas I.5 y I.6 se recogen los datos ecotoxicológicos obtenidos tras la realización de dos estudios de toxicidad (en agua dulce y salada, respectivamente) de distintos metales pesados a los que han sido expuestos diversos organismos (anélidos, moluscos, crustáceos, gasterópodos y peces). Se muestran las concentraciones para cada metal en agua, por encima de las cuales diversos organismos adultos no sobreviven a una exposición aguda de corta duración (4-14 días). Como se aprecia, los niveles dependen fundamentalmente del metal en cuestión, tipo de organismo y condiciones de salinidad. Entre los organismos más sensibles se encuentran los crustáceos y los moluscos bivalvos, estos últimos debido posiblemente a que son organismos filtradores de agua capaces de retener metales tales como cadmio y cobre.

Estos ensayos de toxicidad se realizan en el laboratorio bajo condiciones cuidadosamente controladas, que permiten obtener resultados precisos. Sin embargo, suelen ser poco representativos en comparación con las condiciones reales en las que se encuentran estos organismos en el medio natural, tanto en lo referente a las concentraciones de agentes potencialmente tóxicos presentes en el agua como a su periodo de exposición.

Tabla I.5. Concentración de metales pesados ($\mu\text{g L}^{-1}$) que causan toxicidad (mortalidad) a distintos organismos adultos en ensayos de corta duración (4-14 días) en agua dulce [Crompton, 2007]

Organismo	Concentración a la cual los organismos no sobreviven ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Anélidos	-	>100	-	>100	>100	>1000	>10000	>1000
Moluscos bivalvos	-	-	-	>10	-	-	-	-
Crustáceos	>100	>0,1	-	>1	>0,1	>10	>10	>10
Gasterópodos	-	-	-	>10	-	>10000	>10	-
Peces	>100	>10	>1000	>100	-	>100	>10	>1000

-: no determinado

Tabla I.6. Concentración de metales pesados ($\mu\text{g L}^{-1}$) que causan toxicidad (mortalidad) a distintos organismos adultos en ensayos de corta duración (4-14 días) en agua salada [Crompton, 2007]

Organismo	Concentración a la cual los organismos no sobreviven ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Anélidos	-	>1000	-	>10	>100	>10000	>100	>1000
Moluscos bivalvos	-	>1	>10000	>1	>0,1	>10000	>1000	>10
Crustáceos	>100	>10	>1000	>10	>10	>100	>1000	>100
Gasterópodos	-	-	-	>10	-	>10000	>100	-
Peces	>1000	>100	>10000	>10	>10	>100	>1000	>1000

-: no determinado

Propiedades como la distribución, movilidad, biodisponibilidad, toxicidad y bioacumulación de los metales pesados no sólo van a depender de su naturaleza y concentración, sino que los factores físico-químicos del sistema van a jugar un papel fundamental sobre estas características. Cambios en las condiciones medioambientales, ya sea por causas naturales o antropogénicas, pueden influir fuertemente en el comportamiento de los elementos tóxicos e incluso los esenciales, alterando las formas en las que se presentan en la naturaleza. Algunos de los factores más controlantes son el pH, el potencial redox, la capacidad de las especies reactivas del medio para interaccionar como ligandos complejantes (tanto orgánicos como inorgánicos) y la materia coloidal y particulada que pueden producir adsorción de elementos. La complejación o adsorción de metales por la presencia de estos ligandos, ejerce una fuerte influencia sobre su reactividad, movilidad, biodisponibilidad y toxicidad. Son los metales en su forma libre las especies químicas más disponibles y peligrosas para los organismos [Vega y Weng, 2013]. En la Figura I.6 se muestra una clasificación de la disponibilidad y toxicidad respecto a los organismos vivos de algunos de los elementos de la tabla periódica. Así se clasifican en "no críticos", "tóxicos pero no disponibles" y "tóxicos y disponibles".

Tras los avances en el conocimiento de la influencia de la especiación química en la biodisponibilidad y toxicidad de un determinado contaminante, se pasó de un principal y claro objetivo que consistía en conocer la concentración total de éste, a una gran inquietud por encontrar respuestas para las siguientes preguntas: "*¿en qué formas se encuentra un contaminante en el sistema de estudio?*" y "*¿qué concentración presentan cada una de esas formas en dicho ecosistema?*" [Pérez-Bendito y Rubio, 1999].

Los metales, generalmente en función de su estado de oxidación y de las características del medio, pueden encontrarse formando parte de distintos compuestos, de forma que los análisis de especiación suponen una herramienta esencial para conocer estas formas químicas y así evaluar posibles riesgos en el medioambiente, permitiendo que se realicen previsiones y prevenciones efectivas respecto a la contaminación por metales traza.

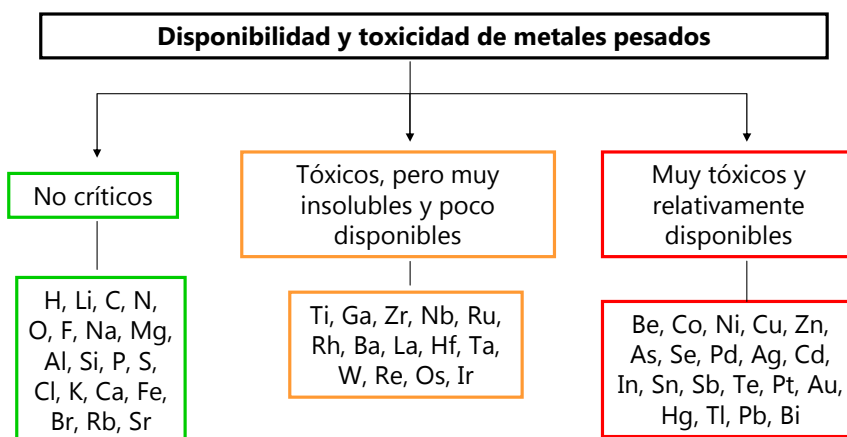


Figura I.6. Clasificación de los elementos según su biodisponibilidad y toxicidad respecto a los organismos vivos [Jurado-González, 2003]

Parece difícil adoptar una definición única y de forma unánime para el concepto de especiación. Muchos autores consideran que las especies se pueden distinguir por su estado de oxidación (especies redox), por su forma molecular (organometales), por su coordinación (complejos), por la fase en la que se encuentra el analito (disuelto, adsorbido, coloidal, en suspensión, etc.) o por su solubilidad en ciertos disolventes (intercambiable, soluble en ácido, etc.) [Ure y Davidson, 2002]. Con objeto de clarificar este concepto la IUPAC, en el año 2000, definió el término **"especie química"** como la forma específica de un elemento definida como su composición isotópica, su estado electrónico o de oxidación y/o su estructura compleja o molecular [Templeton y col., 2000]. En consecuencia, la **"especiación de un elemento"** se define como la distribución de un elemento entre especies químicas definidas en un sistema. Para determinar la especiación, se define el **"análisis de especiación"** como la actividad analítica de identificación y/o medida de las cantidades de una o más especies químicas individuales en una muestra [Caruso y col., 2003; Hirose, 2006]. En 2002, Ure y Davidson definieron la especiación química como el proceso de identificación y

cuantificación de diferentes formas o fases definidas presentes en un material, o bien como la descripción de las cantidades y los tipos de esas especies, formas o fases presentes. Estos autores consideran que la definición de especie química recomendada por la IUPAC es limitada, siendo perfectamente válida para la especiación en muestras líquidas, pero excluye muchos de los estudios de especiación realizados en muestras sólidas, como suelos, sedimentos y materiales geoquímicos y biológicos. Así pues, exponen que numerosos estudios de especiación pertenecerían entonces, según esta organización, al campo de las técnicas denominadas de fraccionamiento o de extracción selectivas [Ure y Davidson, 2002].

Es frecuente encontrar en la bibliografía la definición de especie haciendo referencia a las formas químicas diferentes para un elemento en particular, como por ejemplo el conocido caso del cromo, el cual puede presentarse como Cr(III) o Cr(VI). Existe una gran diversidad de opiniones en cuanto a si el término especiación debería ser empleado también para definir aquellos procesos que determinan varias fracciones de un elemento obtenidas mediante extracciones múltiples. Por todo ello, existe un debate abierto acerca del uso correcto de los términos análisis de especiación y fraccionamiento. Los procedimientos analíticos que no conducen a la identificación de especies químicas pero permiten caracterizaciones de grupos de especies no son considerados por algunos autores como análisis de especiación propiamente dichos. Para una mayor aclaración, la IUPAC en sus recomendaciones emplea el término **"fraccionamiento"**, que se define como el proceso de clasificación de un analito o un grupo de analitos de una cierta muestra de acuerdo a sus propiedades físicas (por ejemplo: tamaño o solubilidad) o químicas (por ejemplo: reactividad o tipo de enlace). Este concepto de fraccionamiento coincide con dos de los tipos de especiación que se conocen en la bibliografía y que se denominan **especiación funcional y operacional**. La primera de ellas hace referencia a la caracterización de las especies en función de su papel en las rutas bioquímicas, mientras que en la segunda se diferencian las especies en función de la operación analítica realizada [Caruso y col., 2003]. En este sentido, los procedimientos de extracción secuencial selectiva se utilizan para aislar metales que se encuentran asociados a las fracciones intercambiable, reducible, oxidable y residual en los sedimentos. Las fases reducible, oxidable y residual se corresponden con los metales asociados, enlazados o adsorbidos en oxihidróxidos de hierro y/o manganeso, en la materia orgánica y/o sulfhídrica y en silicatos, respectivamente. Aunque éste sea un apropiado concepto de especiación, debe enfatizarse que estas asociaciones son simbólicas y pueden malinterpretarse. Por lo tanto, es preferible considerar las fracciones aisladas como aquéllas definidas por el procedimiento operacional. Procedimientos físicos como la división de una muestra sólida en partículas de menor tamaño o el aislamiento de una muestra disuelta de sedimento por filtración, centrifugación o diálisis son también ejemplos de especiación operacional. De hecho, incluso la distinción entre especies solubles e insolubles en sistemas acuáticos puede

ser considerada como especiación operacional puesto que está basada en la definición arbitraria de solubilidad, según la cual una sustancia está disuelta si es capaz de atravesar un filtro de 0,45 μm de tamaño de poro [Ure y Davidson, 2002; van Loon y Duffy, 2011].

Se ha descrito un tercer tipo de especiación en la cual se mide o se define la forma química precisa de un elemento o su estado de oxidación. Es la más difícil de conseguir puesto que se requieren métodos analíticos de gran selectividad y sensibilidad. Algunos de los primeros estudios relacionados con esta forma específica de especiación en agua lograron con éxito separar los estados de oxidación del Cr [Isshiki y col., 1989] o del Sb [Mohammad y col., 1990] utilizando métodos cromatográficos y electroquímicos, mediante el empleo de absorbentes o reactivos específicos. Para muestras sólidas, tales como sedimentos y materiales biológicos, este tipo de especiación rara vez es posible y se debería recurrir a la especiación funcional u operacional.

I.4. Métodos de análisis en especiación metálica

Para llevar a cabo los estudios de especiación metálica, el procedimiento elegido para tal fin debe permitir la distinción entre distintas formas de un mismo metal y entre formas químicas análogas de metales distintos. Es frecuente que alguna o todas las concentraciones de estas formas químicas sean concentraciones muy bajas. Por tanto, se requiere la utilización de métodos analíticos lo suficientemente sensibles para alcanzar niveles trazas o subtrazas, que a la vez sean específicos para cada especie, es decir, que posean gran selectividad.

En numerosas ocasiones estas técnicas presentan ciertas limitaciones o complicaciones debido a [Pickering, 2002]:

- Las dificultades asociadas a la separación o aislamiento de la especie de interés de las matrices naturales que presentan una elevada complejidad.
- La mayoría de las técnicas de especiación disponibles provocan cambios en los equilibrios existentes entre las distintas formas químicas presentes en el sistema de estudio.
- A menudo no se dispone de materiales o muestras de referencia certificados para la correcta validación de las técnicas de especiación.

- Las bajas concentraciones a las que suelen encontrarse las especies en los ecosistemas acuáticos, requieren de técnicas suficientemente sensibles y selectivas, características que no muchos procedimientos analíticos poseen.

A pesar de estas limitaciones, se han llevado a cabo importantes avances en el campo de los análisis de especiación durante los últimos 20 años, de modo que actualmente es posible realizar análisis de especiación para casi cualquier elemento, aunque no para todas las especies de cada elemento [Apostoli y col., 2006]. No obstante, sigue siendo un campo que está en constante desarrollo y que parece seguirá siendo de interés en un futuro.

Entre las técnicas utilizadas, algunas pueden ser aplicadas de forma directa (*especiación directa*), aunque suele ser frecuente separar en una o varias etapas las distintas especies, siendo determinadas cada una de ellas a distintos tiempos o en las diferentes porciones realizando la *especiación mediante técnicas combinadas*.

I.4.1. Métodos directos empleados en especiación metálica

Por métodos de especiación directa se entienden aquellos métodos que pueden ser aplicados sin la necesidad de etapa previa alguna (procesos de separación y/o preconcentración). Es decir, son técnicas que proporcionan información completa al ser aplicadas directamente. No obstante, no muchas técnicas instrumentales presentan estas características de elevada sensibilidad y selectividad como para realizar con éxito estos análisis de especiación. Los más destacados son los siguientes:

- **Métodos de determinación de la composición isotópica de un elemento.** De forma natural, la composición isotópica de un elemento puede variar como consecuencia de procesos de radioactividad o por fraccionamiento cinético de las masas. La técnica de determinación de isótopos estables más frecuentemente aplicada en estos estudios de especiación es la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS) [Caruso y col., 2003; Huang y col., 2009; Mihaljevič y col., 2009].
- **Métodos electroquímicos.** Entre estos métodos destacan los métodos *potenciométricos* (la información analítica se obtiene a partir de una señal de potencial eléctrico que es proporcional a la actividad termodinámica –concentración– de la especie de interés) y los métodos *amperométricos* y *voltamperométricos* (la información analítica es obtenida a partir de la medida de la corriente de respuesta bajo la aplicación de un potencial constante

–amperometría– o de un potencial variable –voltamperometría– con el tiempo. La respuesta es proporcional a la concentración de la especie de interés [Apostoli y col., 2006]. Dentro de estos métodos, destacan las siguientes técnicas:

- *Potenciometría directa con electrodos selectivos*. Existen diversos tipos de electrodos comerciales que son selectivos y se diferencian principalmente en sus rangos de trabajo, límites de detección, grados de error y posibles efectos interferentes. Consiste en un proceso electroquímico basado en fenómenos de intercambio iónico, complejación o precipitación, con los sitios activos en la superficie o en la capa hidratada del electrodo. Algunos electrodos selectivos responden a la presencia de cationes (H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}), aniones (F^- , Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , CN^- , SCN^- , BF_4^- , S^{2-}) o gases (NH_3 , CO_2 , O_2 , NO_2), existiendo también electrodos bioselectivos (basados en reacciones sustrato-enzima) y electrodos biocatalíticos (en los que una capa de enzima o biocatalizador se inmoviliza en una superficie de un electrodo de vidrio selectivo para cationes a través de una membrana semipermeable). El límite de detección de la mayoría de los electrodos comerciales disponibles está dentro del rango de 10^{-6} - 10^{-7} mol L^{-1} [Pickering, 2002; de Marco y col. 2007], lo que limita su aplicación en el análisis de trazas. Por ello, resulta realmente interesante el desarrollo y empleo de nuevos electrodos selectivos de iones con mejores propiedades, orientados a la determinación directa de iones para análisis en campos como el medioambiente o la bioquímica [Kakhki y Rounaghi, 2011].
- Las técnicas de *voltamperometría de redisolución anódica* (Anodic Stripping Voltammetry, ASV) y *catódica* (Cathodic Stripping Voltammetry, CSV) supusieron una gran revolución dentro de las técnicas electroquímicas, siendo bastante útiles para distinguir entre formas estables y lábiles, así como entre estados de oxidación de metales. Además, estas técnicas han permitido obtener información sobre la toxicidad de los metales en muestras de aguas naturales. Sin embargo, sus limitaciones de selectividad y sensibilidad han impedido su aplicación como método directo para especiación en algunos sistemas biológicos. El electrodo de gota de mercurio (Hanging Mercury Drop Electrode, HMDE) es uno de los más recomendados para los análisis rutinarios, por su alta reproducibilidad, sensibilidad y posibilidad de aplicación a un amplio rango de valores de potencial [González y col., 2010]. Además, se han desarrollado electrodos de platino, oro, electrodos rotatorios de carbono vítreo con película de mercurio (Thin Mercury Film – Rotating Glassy Carbon Disk Electrode, TMF-RGCDE) y electrodos modificados de diversas formas. La técnica ASV y la *voltamperometría de redisolución catódica adsortiva* (Adsorptive Cathodic

Stripping Voltammetry, AdCSV) han sido de los métodos directos más aplicados en análisis de especiación de trazas metálicas a bajas concentraciones [Mays y Hussam, 2009; Pesavento y col., 2009]. Así, la técnica ASV ha sido aplicada para la determinación simultánea de cationes como Zn(II), Cd(II), Pb(II) y Cu(II) en agua de mar [Gillain y col., 1979; Locatelli y Torsi, 2000; Annibaldi y col., 2011, Durán y Nieto, 2011], para la determinación simultánea de trazas metálicas como Pb(II) y Cd(II) (empleando un electrodo fabricado con bismuto) [Kokkinos y col., 2008] o para la determinación de Pb(II) empleando electrodos modificados de Hg(II) con óxido de grafeno [Zhao y col., 2013b], entre otras muchas aplicaciones. Asimismo, la técnica AdCSV ha sido bastante aplicada como método de determinación sensible para trazas metálicas en muestras acuosas. Tras la adición de un ligando específico, el complejo formado es capaz de interactuar con el electrodo, como por ejemplo, el de gota de mercurio. Concretamente, en el caso del Cu la determinación por ASV es posible pero no es muy sensible ya que el pico obtenido es ancho y muy próximo al pico de oxidación del mercurio [Ensafi y col., 2006]. Así, se ha conseguido determinar trazas de Cu con buenos resultados mediante el empleo del reactivo 8-hidroxiquinoleína (oxina) [Magnier y col., 2011], trazas de Cu y Cd utilizando como reactivo complejante luminol [Abbasi y col., 2011], o el ácido rubeánico para la determinación de trazas de Cr(VI), el cual ha sido empleado también para la determinación de cationes como Cu(II), Co(II), Ni(II), Fe(III), Ag(I), Bi(III), Hg(I), Pd(II), Pt(II), y La(III) [Abbasi y Bahraei, 2012]. Por tanto, tanto las técnicas ASV como AdCSV han mostrado numerosas ventajas en análisis de trazas metálicas en muestras acuosas, como elevada exactitud y precisión en los análisis, rapidez en los mismos, excelente selectividad y sensibilidad, buenos resultados en muestras con matrices salinas (como aguas de mar y estuario) y posibilidad de analizar muestras con varios analitos sin necesidad de tratamientos previos de concentración [Espada-Bellido y col., 2009a; Abbasi y col., 2011]. Otra de las técnicas más usadas recientemente en análisis medioambientales es la cronopotenciometría de redisolución (Stripping Chronopotentiometry, SCP) [Mota y col., 2012].

- **Métodos espectroscópicos.** Los métodos espectroscópicos son aquellos basados en la interacción de la radiación electromagnética con el analito presente en la muestra. Dentro de este grupo, los más comunes son:

- *Técnicas espectrofotométricas y espectrofluorimétricas.* Presentan como ventajas importantes el ser técnicas de bajo coste y fácil manejo. Sin embargo, en la mayoría de los casos no permiten su aplicación de forma

directa para determinar las formas específicas de un elemento concreto. Por lo general, suelen emplearse acopladas con otras técnicas previas de separación y/o preconcentración, como procesos de intercambio iónico, extracciones con disolventes, etc. Generalmente, se suele añadir un reactivo que, al reaccionar con el metal, forma un complejo específico coloreado o fluorescente [Themelis y col., 2006; Karak y col., 2011]. Éstos suelen ser reactivos cromogénicos que reaccionan con el ión metálico libre, pero también con otras especies complejas del metal, en las que puede desplazar al ligando natural por competición con el ligando añadido [Sánchez-Uría, 1994]. Existen especies como las especies coloreadas oxianiónicas de manganeso y cromo, que pueden ser determinadas espectrofotométricamente sin la necesidad de emplear ningún reactivo [Pérez-Bendito y Rubio, 1999; Town y Filella, 2000]. Incluso se han conseguido llevar a cabo análisis de especiación *in situ* mediante determinaciones colorimétricas, como es el caso del Fe(II) presente en el agua de mar empleando el reactivo Ferene [Meyer y col., 2012].

- *Técnicas de difracción o absorción de Rayos X.* Las técnicas de *difracción de rayos X* (X-Ray Diffraction, XRD), *espectroscopía extendida de estructura fina por absorción de rayos X* (Extend X-Ray Absorption Fine Structure, EXAFS) y *espectroscopía de absorción de rayos X cercana al umbral* (X-Ray Absorption Near Edge Structure, XANES) han permitido la caracterización química de elementos como Zn, Cr, Hg o Pb en muestras sólidas. La mayoría de estas técnicas proporcionan una alta resolución espacial en este tipo de muestras, pero presentan ciertas limitaciones en cuanto a la sensibilidad. Es por ello, que muchas cuantificaciones suelen requerir de un proceso de aislamiento/preconcentración de las especies de interés, por lo que a veces se necesita disponer de suficiente cantidad de muestra [Caruso y col., 2003; Kappen y col., 2008; Hashimoto y col., 2011].
- *Otras técnicas espectroscópicas.* En la especiación química directa pueden emplearse también técnicas como la *espectroscopía de resonancia magnética nuclear* (Nuclear Magnetic Resonance, NMR), la *espectroscopía Mössbauer* (Mössbauer spectroscopy, MS), la *espectroscopía de infrarrojo* (Infrared, IR) y la *espectroscopía de resonancia de espín electrónico* (Electron Spin Resonance, ESR). La principal limitación de estas técnicas radica en la baja sensibilidad o poca especificidad que presentan, por lo que se hace necesario etapas de separación y/o preconcentración. Ha sido posible determinar constantes de formación de complejos metálicos mediante la utilización de la *espectroscopía NMR* [Schmidt y col., 2001; Caruso y col., 2003; Bender-Koch y col., 2009]. A sus inconvenientes, se suma el elevado coste de estos equipos,

que los hace poco viables para su uso en análisis de especiación rutinarios [González y col., 2010].

I.4.2. Métodos de especiación acoplados, combinados o híbridos

Estos métodos surgieron con el fin de corregir las limitaciones en cuanto a falta de sensibilidad o presencia de especies interferentes, que presentaban y presentan numerosas técnicas de determinación. Muchos de estos métodos son frecuentemente empleados hoy día en estudios de especiación de elementos trazas. En ellos se combinan como mínimo dos técnicas analíticas, donde la primera suele ser por lo general una técnica de separación de las especies de interés, que posteriormente son identificadas mediante la segunda técnica analítica que es la que posee mayor sensibilidad. Entre las principales desventajas de estos sistemas, se encuentran la adquisición de más de un equipo, mayor complejidad del método, mayor manipulación y riesgo de cambios en la muestra, y por lo general, mayores tiempos de análisis. La introducción de determinados disolventes en la etapa previa de separación puede ocasionar alteraciones en los equilibrios entre las especies que forman un equilibrio químico. De esta manera existe un riesgo de transformación o destrucción de especies químicas.

En sus comienzos, estos métodos combinados de especiación se realizaban en discontinuo; es decir, primero se llevaba a cabo la etapa previa de separación y, una vez finalizada, se proseguía con la etapa de determinación propiamente dicha. No obstante, con los años y el avance de la tecnología, se fue implantando el uso de sistemas donde ambas técnicas analíticas (separación y detección) se encontraban acopladas y conectadas a través de una interfase. La aparición de estos acoplamientos ofrece la interesante posibilidad de automatización, así como mayor rapidez y una alta reproducibilidad. El empleo de técnicas de separación rápidas y específicas como primera técnica acoplada, tales como por ejemplo la cromatografía líquida rápida de proteínas, la electroforesis capilar o la cromatografía gaseosa multicapilar, permiten reducir el tiempo de análisis y con ello las posibles transformaciones de las especies durante el proceso [Greenway, 2002; Michalke, 2003; González y col., 2009].

A continuación se describen las principales técnicas de separación, los métodos de detección y los acoplamientos más frecuentes aplicados a los análisis de especiación:

- **Técnicas de separación.** Las técnicas de separación que operan con mayor satisfacción desde un punto de vista analítico como primera etapa para luego realizar la detección son las técnicas cromatográficas y las técnicas de separación electroforéticas, siendo las más frecuentemente empleadas las siguientes:

- *Técnicas cromatográficas*. Entre las técnicas cromatográficas destacan la *cromatografía de gases* (Gas Chromatography, GC), *cromatografía de gases capilar* (capillary GC), *cromatografía líquida* (Liquid Chromatography, LC), *cromatografía líquida capilar* (capillary LC o capillary HPLC), *cromatografía líquida de alta resolución* (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), *cromatografía de intercambio iónico* (Ion Exchange Chromatography, IEC o IC), *cromatografía líquida de ultra resolución* (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) [Wilson, 2007; Gros y col., 2008] y *cromatografía en capa fina de alta resolución* (High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC). Esta última ha supuesto una mejora de las técnicas basadas en la *cromatografía de capa fina* (Thin Layer Chromatography, TLC) por ser más robusta, simple, rápida y permitir una gran resolución en los procesos de separación [Attimarad y col., 2011]. En cromatografía, con objeto de mejorar la selectividad y sensibilidad del proceso, es frecuente el empleo de columnas acopladas en serie [Niessen, 2004; Ortiz-Bolsico y col., 2013].
- *Técnicas electroforéticas*. Entre estas técnicas destaca la *electroforesis capilar* (Capillary Electrophoresis, CE), que presenta varias ventajas frente a las técnicas electroforéticas tradicionales, como son instrumentación más moderna, capacidad de automatización y acoplamiento a detectores *online*, alta resolución, bajos tiempos de análisis y posibilidad de poder aplicar altos campos eléctricos, ya que la utilización de capilares favorece la disipación del calor y evita el calentamiento. La electroforesis capilar se puede emplear como técnica de separación primaria o secundaria (como por ejemplo, tras someter a la muestra a la técnica de HPLC), en cuyo caso se clasifica como técnica bidimensional. De esta forma se consigue una mayor resolución y calidad de los resultados [Salas-Solano y Felten, 2008]. Existen diferentes modos de separación para la electroforesis capilar: la *electroforesis capilar de zona* (Capillary Zone Electrophoresis, CZE) donde la separación se basa en la relación carga/masa de las especies; *isotacoforesis capilar* (Capillary Isotachopheresis, CITP) basado en la conductividad del analito; *isoelectroenfoque capilar* (Capillary Isoelectric Focusing, CIEF) basada en el punto isoeléctrico; *electroforesis capilar en gel* (Capillary Gel Electrophoresis, CGE), realizada sobre una matriz de poliacrilamida, agarosa y metilcelulosa, entre otras; y *cromatografía capilar electrocinética micelar* (Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC), basada en el carácter hidrófobo del analito [Cornelis y Nordberg, 2007; Bosserhoff y Hellerbrand, 2010].
- *Técnicas de extracción*. Las técnicas convencionales de *extracción líquido-líquido* así como la *extracción en fase sólida* continúan siendo técnicas de separación muy aplicadas, aunque se ha producido un gran auge en el

desarrollo y aplicación de diversas configuraciones de las técnicas de *microextracción en fase sólida* (Solid Phase Microextraction, SPME) y las de *microextracción con gota suspendida* (Single-Drop Microextraction, SDME), que son de gran interés por emplear un menor volumen de muestra y de disolventes utilizados, así como un menor tiempo de análisis y posibilidad de automatización [Vieira y col., 2009; Mehdinia y Aziz-Zanjani, 2013]. Las técnicas basadas en separación y preconcentración por extracción en fase sólida o líquida, así como las basadas en procesos de complejación, coprecipitación y reacciones redox, métodos de destilación/vaporización y técnicas de fraccionamiento (como la membrana Donnan) también han sido ampliamente desarrolladas y aplicadas a la determinación de trazas metálicas [Gonzálvez y col., 2009].

- **Métodos de detección.** Entre los más frecuentes se encuentran la *espectroscopía de absorción atómica* (Atomic Absorption Spectrometry, AAS) cuya atomización puede ser por llama (Flame-AAS o F-AAS) o por horno de grafito (Graphite Furnace-AAS o GF-AAS), siendo éste último más sensible en varios órdenes de magnitud. En cuanto a los métodos de emisión atómica (Atomic Emission Spectroscopy, AES) destacan la *espectroscopía de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente* (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy, ICP-OES) y la *espectroscopía de emisión óptica con plasma inducido por microondas* (Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectroscopy, MIP-OES). También se emplean la *espectroscopía de fluorescencia atómica* (Atomic Fluorescence Spectroscopy, AFS), la *espectrometría de masas* (Mass Spectrometry, MS) y la *espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo* (ICP-MS) [Somogyi, 2008; Fitzpatrick y Glennon, 2011; Sanz-Medel y col., 2013], así como equipos capaces de medir propiedades como la absorción de radiación ultravioleta-visible, fluorescencia, índice de refracción o quimioluminiscencia [Moldoveanu y David, 2013].

Las características principales que deben poseer los sistemas de detección son: elevada sensibilidad, alta reproducibilidad en las respuestas, ofrecer linealidad en un amplio rango de concentraciones, posibilidad de operar con pequeños volúmenes de muestra y ser estables a cualquier cambio en los parámetros ambientales. Algunos detectores generan únicamente información cuantitativa, mientras que otros permiten obtener además información cualitativa, como es el caso de los espectrómetros de masas [Moldoveanu y David, 2013].

Estas técnicas son extremadamente sensibles y, para que sean verdaderamente útiles, deben combinarse de una forma adecuada con procesos previos de separación, como los siguientes.

- **Métodos combinados (técnica de separación y método de detección).**

Existen una gran variedad de métodos híbridos, entre los que destacan los expuestos a continuación.

- Un tipo de acoplamiento o combinación bastante usual es el empleo de la cromatografía de líquido, gas o iónica como técnica de separación, unido a una detección mediante *espectrometría de ICP-MS*. El acoplamiento de la cromatografía a este método de detección, hace que la falta de especificidad de la mayoría de los detectores cromatográficos se ve altamente mejorada por la alta especificidad y sensibilidad que presenta esta técnica espectrométrica [Miravet y col., 2010; Malik y col., 2012]. Este tipo de hibridación se ha consolidado como un gran método para análisis de aguas, suelos, alimentos, muestras clínicas y otras [Hill, 2007]. Otros métodos de detección que suelen acoplarse a las técnicas cromatográficas son el ICP-OES y MIP-OES [Wuilloud y col., 2004; Broekaert y Siemens, 2004]. Así, se ha conseguido realizar análisis de especiación de elementos de gran interés como el mercurio en muestras de petróleo crudo empleando la técnica híbrida GC-ICP-MS [Pontes y col., 2014], en marisco mediante LC-ICP-MS [Batista y col., 2011], o en muestras de agua de mar y peces mediante la técnica IC-ICP-MS [Chen y col., 2013].
- También se ha empleado para estudios de especiación metálica el acoplamiento de detectores con técnicas de separación electroforéticas. Estos sistemas a menudo están acoplados con detectores de UV, obteniéndose información a nivel molecular, y también con *espectrómetros de ICP-MS*, *espectrómetros de masas con ionización por electrospray* (Electro-Spray Mass Spectrometry, ESMS) o *espectrómetros de AFS* [Wang y col., 2006a], para obtener la información a nivel elemental o molecular [Dressler y col., 2011; Timerbaev, 2013a]. Dada la alta resolución de la técnica de electroforesis capilar y su alta velocidad de análisis, se han podido realizar análisis cuantitativos como la especiación de selenio en muestras de agua potable, agua de río, sedimentos, suelos, orina o levadura, entre otras [Morales y col., 2008]; especiación de arsénico en muestras de agua de río y lago [Li y col., 2005]; determinación de diez especies distintas de arsénico en muestras de agua subterránea, plantas y carne de pollo [Liu y col., 2013a]; especiación de vanadio en aguas naturales subterráneas [Chen y col., 2007] y especiación de actínidos [Timerbaev y Timerbaev, 2013b].

- Se han aplicado procedimientos de preconcentración y/o separación mediante las técnicas de *extracción en fase sólida* convencional (Solid Phase Extraction, SPE) o la *microextracción en fase sólida* en línea con la gran sensibilidad y selectividad que ofrece la técnica ICP-MS. Otros métodos de detección empleados son AAS, AFS, MIP-OES. Además, se ha llevado a cabo el acoplamiento de estas técnicas de separación/preconcentración con las técnicas de electroforesis capilar, cromatografía de líquido y de gases. Mester y Sturgeon recogieron aplicaciones de esta técnica combinada de microextracción en fase sólida en trabajos científicos publicados entre los años 2000-2004 para la especiación de trazas metálicas de elementos como mercurio, selenio, arsénico, plomo, manganeso, antimonio, germanio, quelatos metálicos y elementos no metálicos [Mester y Sturgeon, 2005]. También han podido determinarse trazas metálicas en muestras biológicas como pelo humano, orina o sangre vacuna [Burguera y Burguera, 2009] o de Zn(II) en muestras acuosas [Escudero y col., 2010].

1.4.3. Métodos de especiación basados en modelos matemáticos

Como se ha expuesto con anterioridad, la composición química de los ecosistemas acuáticos es realmente compleja, ya que contienen un gran número de elementos químicos que pueden presentarse en multitud de formas químicas. Otra complejidad añadida es la baja concentración a la que se presentan estos compuestos (normalmente por debajo de 10^{-6} mol L⁻¹), lo que dificulta aún más los análisis de especiación. La gran información que aportan los estudios de especiación, sobre todo desde un punto de vista toxicológico, suscita un gran interés en el desarrollo de nuevos métodos que ofrezcan la posibilidad de realizar predicciones fiables de especiación química a través de cálculos matemáticos [Huber y col., 2002].

Estos métodos implican la resolución de numerosas ecuaciones simultáneas, entre las que se encuentran balances de masas y las correspondientes a los equilibrios químicos de las especies. Los datos de entrada o de partida requieren conocer las concentraciones totales de cationes, aniones, así como de los distintos ligandos presentes en el medio y los valores de las constantes de equilibrio que se encuentren implicadas en las posibles interacciones entre especies. En el caso de ecosistemas acuáticos hay que tener en cuenta los equilibrios termodinámicos de las especies químicas en disolución y de las que se encuentran en fase sólida, siendo necesario describir las ecuaciones de las reacciones químicas implicadas en todos los procesos. También han de tenerse en cuenta los procesos de adsorción, por los cuales los metales tienden a formar parte de la materia húmica o de coloides inorgánicos en disolución, alterándose por tanto la movilidad de las especies y su importancia

medioambiental. Todas estas cuestiones previas son importantes a la hora de definir el sistema de estudio, sobre todo si se trata de ecosistemas complejos. Algunos de los complejos más difíciles de estimar son los formados entre los metales y la materia orgánica, ya que los datos para estas constantes de equilibrio no suelen estar disponibles. Por ello, han surgido nuevos modelos y programas de especiación que consideran estas interacciones con la materia orgánica (GEOCHEM, PHREEQUE, ECOSAT, WHAM, JESS, OLI). Uno de los modelos matemáticos de especiación más ampliamente usados y que tiene en cuenta los fenómenos de complejación con la materia orgánica es el programa MINTEQA2 (versión mejorada de MINTEQ) [Florence, 1982; Waite, 1989; Pickering, 2002; Huber y col., 2002; Kyle y col., 2011].

Otros modelos que también han sido aplicados son el Modelo de Actividad de Iones Libres (Free Ion Activity Model, FIAM), el cual correlaciona los fenómenos de biodisponibilidad, absorción y toxicidad de los metales con su concentración en su forma iónica libre [Vink, 2009, Brown y Markich, 2000]. Igualmente, cabe destacar el Modelo del Ligando Biótico (Biotic Ligand Model) que permite evaluar de manera cuantitativa la especiación y disponibilidad biológica de los metales presentes en los sistemas acuáticos, en función de la química de éste. La gran suposición de este modelo es que la toxicidad de un determinado metal está relacionada con su ión en forma libre, pero que debe reaccionar con determinados sitios de unión presentes en los organismos [Iordache y col., 2009]. Además, el modelo BLM tiene en cuenta el hecho de que los cationes Ca, Mg, K y Na pueden competir con los iones metálicos por los sitios de unión, y disminuir así la potencial toxicidad de los iones metálicos libres [Wang y col., 2010b]. Los modelos más recientes han contemplado la formación de complejos con la materia orgánica presente en el medio para una predicción más rigurosa de la concentración de iones libres [Clifford y McGeer, 2010].

También conviene destacar el modelo conocido por las siglas WHAM (Windermere Humic Aqueous Model) como modelo predictivo de especiación metálica, bioacumulación y/o toxicidad. Este modelo permite la predicción de las distintas formas químicas de las especies metálicas siempre que se disponga de datos como pH, metal disuelto, carbono orgánico disuelto y concentraciones de los iones presentes en el medio. No obstante, la naturaleza variable de la materia orgánica otorga cierta incertidumbre al método. Este modelo ha sido empleado combinado con el de BLM, el cual simula la acumulación de metales en las membranas bióticas [Bourgeault y col., 2013].

Estos modelos basados en cálculos matemáticos son, de por sí, un campo de estudio desafiante debido a la complejidad de los sistemas medioambientales, la heterogeneidad de los ligandos orgánicos e inorgánicos, y la falta o incertidumbre de algunos parámetros del sistema estudiado [Vega y Weng, 2013]. A menudo son

modificados y mejorados por los investigadores para cada caso concreto, según las necesidades requeridas, como el propuesto por Richards y colaboradores para estudiar los efectos de la acidificación de las aguas oceánicas en la especiación de cobre [Richards y col., 2011]. Asimismo ha conseguido estudiarse la especiación de arsénico también en aguas ácidas de manantiales y ríos [Lenoble y col., 2013] o la especiación de metales de transición en sistemas que son de interés desde un punto de vista geoquímico e hidrometalúrgico [Wang y col., 2010c], y otros muchos ejemplos [Iordache y col., 2009].

No obstante, no hay ningún modelo matemático que se considere perfecto aunque, bien aplicados, todos pueden resultar bastante útiles.

1.5. Especiación metálica en compartimentos naturales acuáticos: aguas y sedimentos

1.5.1. Especiación en aguas naturales

Como se ha indicado los metales se encuentran en los ecosistemas acuáticos en equilibrio químico entre sus formas iónicas libres, compuestos o complejos orgánicos o inorgánicos disueltos, o bien adsorbidos sobre partículas orgánicas o inorgánicas (Figura I.7). La superficie de las partículas inorgánicas (como partículas de arcilla, limo, óxidos de hierro y manganeso) y orgánicas (algas unicelulares, materia orgánica) se encuentra dominada por grupos O^- . Dependiendo de la afinidad de cada metal en particular por estos grupos, predominará su adsorción sobre ellos o tenderá a encontrarse en forma disuelta (como ión libre o compuestos solubles). El equilibrio que presenta un determinado metal entre todas sus formas químicas posibles puede verse alterado ante cualquier cambio en las condiciones fisicoquímicas del medio. Un claro ejemplo se observa en las aguas de estuario, donde la especiación de los elementos cambia principalmente debido a un aumento de la salinidad. Así, algunos metales (como el cadmio) previamente adsorbidos a materia orgánica pueden solubilizarse al formar complejos más estables y solubles con el ión cloruro que aportan las aguas más saladas. Otro hecho es que disminuyen las concentraciones metálicas libres en la columna de agua, ya que estas formas suelen precipitar como consecuencia de procesos de floculación y precipitación de la materia orgánica disuelta y suspendida [Bjerregaard y Andersen, 2007].

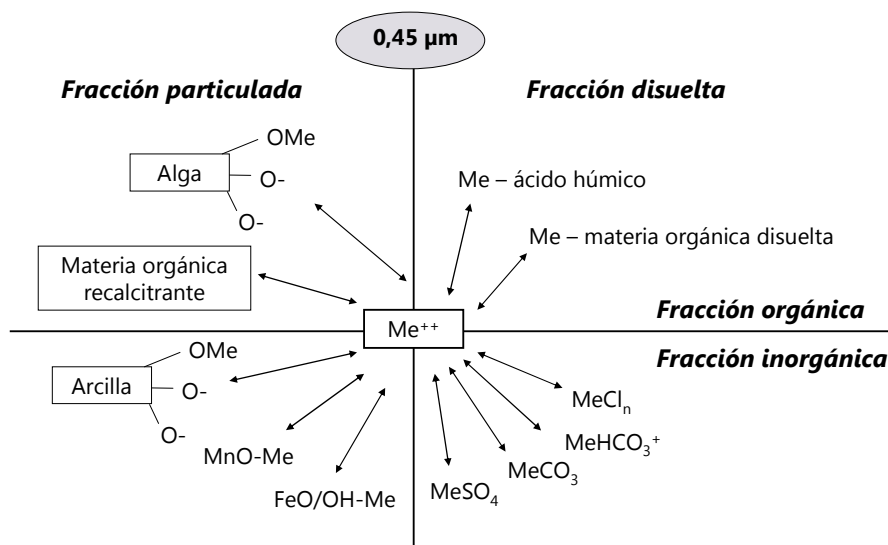


Figura I.7. Esquema de la especiación metálica en aguas naturales, diferenciando entre la forma iónica libre del metal y algunos de sus compuestos orgánicos y/o inorgánicos, disueltos y/o particulados [Bjerregaard y Andersen, 2007]

La solubilidad de los compuestos metálicos en agua es de gran importancia desde un punto de vista medioambiental, por ser uno de los principales factores que favorecen una mayor disponibilidad y posible absorción de los mismos. El proceso de solubilidad de un compuesto metálico en agua depende, entre otros factores, de la presencia de protones (pH) y otros iones en el medio, estado de oxidación del metal y de la velocidad de los procesos de oxidación-reducción. Por lo general, compuestos como nitratos, acetatos, cloruros, bromuros y yoduros metálicos son solubles, excepto algunos referentes a elementos como Ag, Hg(I) y Pb. Los sulfatos, exceptuando los formados por Ba, Sr y Pb, son también solubles. Las sales de cationes como Na, K y NH_4 son usualmente solubles, salvo algunas excepciones. En cambio, los hidróxidos suelen ser compuestos insolubles (excepto los hidróxidos de metales alcalinos, bario o amonio), así como los carbonatos y fosfatos (salvo los correspondientes a metales alcalinos, alcalinotérreos y amonio). La solubilidad de las sustancias poco solubles va a verse altamente influenciada por el tamaño de partícula y el diámetro aerodinámico de las mismas [Cornelis y Nordberg, 2007].

La concentración total de un determinado metal en un ecosistema acuático se encuentra distribuida entre la fase líquida y los sedimentos. En el agua, los metales se reparten entre las fases particulada y disuelta, esta última formada por especies

solubles en agua y coloides [Huang y col., 2012a]. En aguas naturales, dichas fracciones disuelta y particulada se dividen físicamente por filtración de acuerdo a un límite definido operacionalmente (0,45 μm) [Ren y col., 2010]. Debido a procesos como la adsorción, complejación y co-precipitación, solamente una pequeña fracción metálica se encuentra en forma disuelta como ión libre. Las especies metálicas que forman parte de la fracción soluble se encuentran mayoritariamente en forma de iones o complejos orgánicos e inorgánicos. Una gran cantidad de los metales se deposita en los sedimentos, estimándose que entre el 30 y 98% de la carga metálica total en un río puede ser transportada asociada a sedimentos. Así pues, los sedimentos constituyen una potencial fuente de contaminación difusa [Varol y Şen, 2012]. Cuando ocurre la resuspensión de sedimentos, muchos metales (en sus formas disueltas y particuladas) vuelven a la columna de agua, donde los metales disueltos pueden ser asimilados fácilmente por los organismos marinos causando bioacumulación [Zheng y col., 2013a].

La materia orgánica ejerce un papel fundamental en cuanto a la especiación metálica en aguas. La materia orgánica en los ecosistemas acuáticos proviene en gran medida de los organismos vivos y de las fuentes de contaminación. En el agua dulce, la materia orgánica existe normalmente a concentraciones más altas que en el agua de mar. Por otro lado, en las aguas intersticiales de los sedimentos, en algunas aguas costeras con exceso de fitoplancton y en aguas altamente contaminadas pueden medirse cantidades de materia orgánica hasta diez veces superiores que en agua dulce; y en consecuencia, la formación de complejos orgánicos en estos medios es probablemente muy importante [Pérez-Bendito y Rubio, 1999]. También son de gran interés las sustancias húmicas, sustancias orgánicas de lenta degradación o mineralización. Representan la porción biorefractaria del carbono orgánico total en un ecosistema y están formadas por macromoléculas polielectrolíticas, con grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, de elevado peso molecular [Calace y col., 2010; Manahan, 2010]. Su destino final es, principalmente la incorporación a los sedimentos, más que su degradación química o biológica. Se forman por la actividad biológica de microorganismos y por cambios bioquímicos de residuos orgánicos. En función de su solubilidad, las sustancias húmicas se clasifican en tres grupos principales: ácidos fúlvicos (solubles en medio acuoso), ácidos húmicos (insolubles bajo condiciones ácidas) y huminas (permanecen insolubles para todo el rango de pHs). Los materiales húmicos están presentes en suelos, aguas, sedimentos y carbón. Los ácidos húmicos presentan interesantes características como adsorbentes de agua y sustancias químicas, entre las que destacan los metales pesados. En base a este hecho, han sido empleadas como sustancias extractantes utilizadas para la descontaminación de áreas afectadas por la presencia de metales [Kalina y col., 2013]. En concreto, los coloides orgánicos desempeñan un papel muy importante en la geoquímica de los elementos mayoritarios y trazas presentes en las aguas superficiales. Debido a su pequeño tamaño, tienden a no depositarse y permanecen suspendidos en la columna de agua.

Además, su alta energía superficial y su gran área de superficie específica hace que estos coloides sean captadores activos de metales trazas disueltos. Estos fenómenos hacen que los coloides tengan un gran interés en relación a la especiación y transporte de metales traza en aguas. Es por ello, que aunque se engloban en la fracción disuelta, los coloides son considerados como un grupo diferenciado [Singhal y col., 2006; Ren y col., 2010].

Otra fracción considerable de metales pesados en las aguas se encuentra adsorbida sobre coloides inorgánicos y materia particulada, tales como silicatos no arcillosos (cuarzo, sílice, opalina), arcillas (montmorillonita, caolinita, illita), carbonatos (calcita, dolomita), óxidos de Fe/Mn (goetita, magnetita), fosfatos (apatito) y sulfuros (mackinawita). La superficie de las arcillas está predominantemente cargada negativamente, por lo que pueden adsorber iones metálicos a los valores de pH que prevalecen en la mayoría de los ecosistemas naturales. De forma parecida, los óxidos hidratados metálicos, pueden intercambiar protones e iones OH^- por cationes y aniones, respectivamente, con lo que disminuye su biodisponibilidad en el medio. La materia particulada representa una pequeña fracción de los ecosistemas acuáticos; sin embargo, su gran número y superficie total facilita la adsorción de especies. Los tamaños varían incluso desde unos pocos nanómetros a varias decenas de micra. La distribución usual entre las partículas inorgánicas y orgánicas es de poca significación ambiental ya que las partículas inorgánicas se sabe que están rodeadas por materia orgánica adsorbida [Pérez-Bendito y Rubio, 1999; Sun y col., 2013].

Por último, es de destacar la presencia en aguas naturales de ligandos de origen antropogénico, tales como EDTA (ácido etilendiaminetetraacético) y NTA (ácido nitrilotriacético), los cuales tienen una gran capacidad complejante. El primero es de frecuente utilización en un amplio rango de actividades industriales, farmacéuticas y agrícolas, lo que unido a su escasa biodegradación hace que se encuentre presente en aguas subterráneas, efluentes de aguas residuales, aguas dulces y aguas de estuarios. Este ligando puede contener elementos radiactivos si procede de vertidos industriales, ya que suele emplearse para la descontaminación de residuos nucleares. Por su parte, el NTA es ampliamente utilizado desde hace unos años como sustituyente de los compuestos de fósforo de los detergentes, con el fin de minimizar el efecto eutrofizante que causaban estos compuestos sobre los cauces de las aguas naturales. Estos y otros ligandos antropogénicos forman complejos acuosos estables con muchos radionucleidos y metales y, por lo tanto, pueden aumentar su movilidad por el medio ambiente [Marín-Galván, 2003; Reinoso-Maset y col., 2012].

Para realizar estudios de especiación en aguas naturales se aplican métodos analíticos diversos, aunque también pueden emplearse indicadores biológicos (bioindicadores), los cuales acumulan metales en altas concentraciones, de forma que

facilitan la medida de estos contaminantes. Además, pueden evaluarse los posibles efectos biológicos en estos bioindicadores a partir de la medida de biomarcadores en los propios organismos. Las especies frecuentemente estudiadas en agua dulce son briofitas y gamáridos, siendo bioindicadores bastante fiables en el área de la biodisponibilidad metálica, por ser grandes acumuladores en la cadena trófica [Bourgeault y col., 2013].

Entre los objetivos de la presente Tesis se encuentra la especiación metálica en las aguas de la Bahía de Algeciras (Capítulo IV). Para llevar a cabo estos estudios, se realizará un estudio de especiación por fraccionamiento de las especies en función de su tamaño (filtración) y de su labilidad como función de pH, para finalmente determinar el contenido de los metales Zn, Cd, Pb y Cu mediante la técnica de Voltamperometría de Redisolución Anódica de Pulso Diferencial (Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry, DPASV). El esquema de especiación seleccionado permite estudiar cada metal según su afinidad por formar compuestos lábiles, poco lábiles y no lábiles. No obstante, en el capítulo correspondiente se detallarán más extensamente estos estudios.

1.5.2. Especiación en sedimentos

Los estudios de especiación y distribución metálica en sedimentos se han convertido en una de las áreas más importantes en el campo de la investigación de la contaminación medioambiental. Dichos estudios no sólo orientan sobre la calidad del agua sobrenadante del sedimento, sino que también aportan información sobre el transporte y destino de los contaminantes [Zhang y col., 2012; Chakraborty y col., 2012a]. Como se expuso en el apartado anterior, los metales pesados son escasamente solubles en agua y se adsorben principalmente sobre las partículas en suspensión. Tras una serie de procesos, los metales depositados sobre coloides y otras partículas pueden acabar depositándose en los sedimentos, por lo que éstos se convierten en los principales sumideros de metales pesados y otros contaminantes. Sin embargo, cuando la contaminación excede las capacidades de carga de los sedimentos o se producen cambios en las condiciones del medio, los metales pueden ser liberados desde los sedimentos y causar el deterioro del medio ecológico ocasionando una verdadera amenaza para los organismos a través de las cadenas tróficas [Guo y col., 2010].

Los sedimentos se encuentran compuestos principalmente por una mezcla de compuestos insolubles. Predominan los silicatos, que se consideran los componentes mayoritarios en suelos y sedimentos. Además, contienen minerales secundarios formados por la erosión ambiental (principalmente arcillas y óxidos, entre los que destacan los óxidos de Fe). La actividad biológica contribuye también a la

heterogeneidad en la composición de los sedimentos, aportando sustancias húmicas y demás materia orgánica, así como especies inorgánicas (carbonatos). Los silicatos constituyen más del 90% de la corteza terrestre y, en extensión, de muchos suelos y sedimentos. Componentes principales de los silicatos son la sílice, el cuarzo y el feldespato (minerales gruesos, >0,05 mm de diámetro). En cuanto a la composición restante, predominan los minerales arcillosos (montmorillonita, caolinita), constituidos por partículas más pequeñas (<0,002 mm de diámetro). En menores concentraciones se encuentran los óxidos de Fe y Mn, así como materia orgánica y carbonácea (por ejemplo, sustancias húmicas, carbón, hulla), que pueden acumularse en los sedimentos con el paso del tiempo. Dada esta composición tan rica que ofrecen los sedimentos, los metales trazas disponen de muchos sitios a los que unirse o asociarse. Estas uniones, asociaciones o enlaces determinarán posteriormente su concentración, especiación y movilidad [Zhong y Wang, 2008]. Los carbonatos, silicatos, minerales arcillosos y la materia orgánica son compuestos con una alta capacidad de adsorción [Ertefai y col., 2010].

Uno de los métodos que ha adquirido un mayor interés en los últimos años para determinar la composición mineralógica de suelos y sedimentos es la absorción de radiación infrarroja. La nueva generación de espectrómetros infrarrojos se basa en el interferómetro de Michelson y se conocen como espectrómetros infrarrojos por transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared spectrometry, FTIR). Presenta algunas ventajas sobre otras técnicas en términos de sensibilidad, resolución y precisión en el número de onda. Estas ventajas hacen que esta técnica sea muy adecuada para la caracterización de los sedimentos cuando es usada junto con otras técnicas [Suresh y col., 2011] como la *difracción de Rayos X*, la *espectroscopía EXAFS*, la *espectroscopía XANES* y más recientemente, la *resonancia magnética nuclear* y la *espectroscopía Mössbauer*. Con estas técnicas se han determinado las especies de los elementos mayoritarios en los componentes de los suelos y sedimentos, como los minerales de arcilla, hierro, manganeso y los oxihidróxidos de aluminio y materiales húmicos, así como la estructura de estos componentes [Ure y Davidson, 2002]. No obstante, ofrecen poca sensibilidad.

Muchos metales pueden encontrarse en su forma iónica retenidos por intercambio iónico sobre las arcillas, enlazados a óxidos hidratados de hierro o manganeso, formando quelatos con las sustancias húmicas insolubles, presentes en la estructura de minerales secundarios como carbonatos, sulfatos u óxidos, entre sus principales formas, formando complejos con la materia orgánica o en la red cristalina de minerales primarios como silicatos [Gismera y col., 2004]. La forma química de los metales va a depender de muchos factores, destacando el potencial redox (pE). En la Tabla I.7 se muestran ejemplos de compuestos específicos de elementos traza presentes en sedimentos de ecosistemas acuáticos que pueden predominar bajo condiciones

oxidantes o reductoras. En todo momento, y dependiendo de los ligandos así como de los cambios en las condiciones del medio, los metales asociados al material sedimentario o suspendido pueden solubilizarse y provocar la liberación de estos metales.

Debido a la naturaleza generalmente anóxica de los sedimentos, su recolección y tratamiento para un estudio de especiación metálica debe realizarse con cuidados especiales. Particularmente, el contacto con el oxígeno atmosférico puede oxidar rápidamente el Fe (II) y el Mn(II) intercambiables, siendo transformados a óxidos no intercambiables que contienen los metales en estados de oxidación más altos, como el Fe_2O_3 y MnO_2 . Por lo tanto, las muestras de sedimentos deben sellarse y refrigerarse lo más pronto posible después de ser recolectadas [Manahan, 2010].

Tabla I.7. Especies inorgánicas estables de metales traza presentes en sedimentos bajo condiciones oxidantes o reductoras [Manahan, 2010]

Metal	Formas estables bajo condiciones oxidantes	Formas estables bajo condiciones reductoras
Cd	CdCO_3	CdS
Cu	$\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$	CuS
Fe	$\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot x(\text{H}_2\text{O})$	FeS , FeS_2
Mn	$\text{MnO}_2 \cdot x(\text{H}_2\text{O})$	MnS , MnCO_3
Hg	HgO	HgS
Ni	$\text{Ni}(\text{OH})_2$, NiCO_3	NiS
Pb	PbCO_3 , $\text{Pb}(\text{OH})_2$	PbS
Zn	ZnCO_3 , ZnSiO_3	ZnS

Puesto que los sedimentos están compuestos por mezclas heterogéneas de diferentes sustancias orgánicas y organominerales, arcillas, óxidos de hierro, aluminio y manganeso, así como una gran variedad de sustancias solubles, los mecanismos de enlace de los metales traza en sedimentos son diversos y varían según la composición de los mismos y sus propiedades físicas. En la Tabla I.8 se resumen algunas de las diferentes asociaciones encontradas para los metales pesados en los sistemas acuáticos sedimentarios, así como los posibles mecanismos de liberación del metal en los análisis químicos [Pickering, 1986; Pickering, 2002].

Existen diversas técnicas o métodos empleados con el fin de conocer la especiación de los metales pesados y su interacción con los distintos sitios de unión presentes en suelos y sedimentos. Destacan en este sentido las técnicas acopladas,

técnicas de flujo, métodos de extracción cinéticos o técnicas *in situ* como la de gradiente de difusión en capa fina (Diffusive Gradient in Thin-films, DGT) [Chakraborty, 2012b].

Tabla 1.8. Asociaciones de los iones metálicos en sedimentos de sistemas acuáticos y mecanismos de liberación del metal [Pickering, 1986; Pickering, 2002]

Componentes de los sedimentos	Origen del contenido metálico	Mecanismo de liberación
Fragmentos de rocas (minerales) con diferentes tamaños de grano (grava, arena, limo, arcilla)	Metales enlazados principalmente en posiciones inertes, en las estructuras cristalinas	Destrucción completa de la estructura
Capas de fragmentos (p.ej: CaCO_3)	Metales adsorbidos físicamente por pseudomorfosis, coprecipitados con los carbonatos	Disminución del pH, cambios en pCO_2
Orgánicos (lípidos, sustancias húmicas, residuos orgánicos)	Metales adsorbidos físicamente. Complejos metálicos. Metales adsorbidos químicamente (intercambiados por H^+ en los grupos ácidos y alcohólicos)	Modificación del pH, destrucción de la fracción orgánica
Precipitados (hidróxidos, carbonatos, sulfuros)	Precipitación por saturación de las especies solubles en la fase acuosa	Procesos que aumentan la solubilidad (ej: disminución del pH, agentes quelatantes)
Hidróxidos y óxidos de Fe/Mn	Coprecipitación de los hidróxidos metálicos. Adsorción física. Adsorción química (intercambio de protones)	Disolución parcial en ácidos, reducción de Fe y Mn
Sulfuros	Coprecipitación con los sulfuros	Oxidación de sulfuros
Carbonatos	Formando parte de conchas	Disolución en ácidos débiles
Compuestos ácidos orgánicos	Sales de metales poco solubles	Variación de pH, destrucción de la materia orgánica

De ellos, el método de extracción cinética es barato, simple y sensible en comparación con otros métodos. Es capaz de ofrecer información sobre la distinta

cinética que presentan los diversos complejos metálicos en suelos y sedimentos, así como sus velocidades de disociación correspondientes. En definitiva, aporta información sobre la labilidad de ciertas especies metálicas en los sistemas naturales. Los metales trazas son cuantificados en un extracto (que contiene un agente quelatante adecuado) en función del tiempo, hasta que alcanzan el estado de equilibrio. Estos estudios de especiación dependientes del tiempo son útiles para entender el transporte, destino y biodisponibilidad de los metales pesados. Este método ha sido exitosamente aplicado para predecir la velocidad de absorción de los metales por plantas y otros organismos vivos presentes en los sistemas naturales [Gismera y col., 2004; Chakraborty, 2012b].

A lo largo de los años, han surgido muchos procedimientos de extracción química para estimar la biodisponibilidad de los metales traza en sedimentos y suelos respecto a los organismos vivos. Sin embargo, no existe acuerdo sobre cuál es el extractante que estima con mayor exactitud la labilidad o biodisponibilidad de los metales. Los procedimientos de extracción simple (una sola etapa) son una herramienta barata y rápida para este tipo de estudios. Dependiendo de la naturaleza del extractante empleado, estos métodos se dividen en 3 categorías: los que emplean sales (ej.: CaCl_2), soluciones ácidas (ej.: HCl) o agentes complejantes/reductores (ej.: EDTA). No obstante, la asociación de los metales en las diferentes fases del sedimento no puede ser explicada ni mediante el método de extracción cinética ni por extracciones simples [Leleyter y col., 2012].

El método de extracción secuencial (varias etapas secuenciales) ofrece información sobre la distribución de los metales según su asociación con diferentes fases sólidas de los sedimentos (soluble en agua, intercambiable, asociada a carbonato, asociada a óxidos de Fe y Mn, asociada a materia orgánica, sulfuros, fracción mineral o residual). Tiene la ventaja de que permite caracterizar las distintas fracciones lábiles, mediante diversas extracciones que se llevan a cabo de una forma secuencial. Las primeras son las menos agresivas y más específicas, de manera que se van haciendo progresivamente más destructivas. Este método permite entender la distribución, movilidad y biodisponibilidad de los metales estudiados [Leleyter y col., 2012; Horváth y col., 2013].

El objetivo de este método de extracción secuencial es que el empleo de sucesivos reactivos (simples o mezcla) puede liberar paso a paso el metal asociado a las fracciones o fases específicas del sedimento, de modo que se delimita más el acceso de cada reactivo a una fase en concreto y aumenta de este modo la especificidad del método [Baeyens y col., 2003]. Desde finales de la década de los 70 y principios de los 80 se han desarrollado una gran variedad de esquemas secuenciales de extracción.

Tessier y colaboradores se encuentran entre los primeros autores que desarrollaron y describieron un procedimiento secuencial de extracción para el estudio de la especiación metálica en suelos [Tessier y col., 1979], y de aplicación en sedimentos.

Todos los procedimientos de extracción secuencial están basados en la posible presencia en los sedimentos de las siguientes especies metálicas:

- Solubles en agua
- Intercambiables
- Enlazadas a materia orgánica
- Asociadas a óxidos de hierro y manganeso
- Formando parte de carbonatos, fosfatos o sulfuros
- Enlazadas a los silicatos que forman el suelo o el sedimento (presentes en lo que se denominaría la fracción residual)

La gran diversidad y la falta de uniformidad tanto de los métodos de extracción simple, así como de los esquemas de extracción secuencial, no permitían adecuadamente realizar la comparación de los resultados [Jouanneau y col., 1983; Nirel y Morel, 1990; Hlavay y col., 2004]. A esto, se sumaba la ausencia de materiales de referencia adecuados para la validación de la metodología. Estos problemas unidos a las muchas fuentes de errores aleatorios que presentaban estos métodos, hacía pensar que el uso de los esquemas de extracción sería abandonado de manera progresiva. Sin embargo, dada la valiosa información que proporcionan estos métodos, el Community Bureau of Reference (BCR), actualmente Measurements and Testing Programme (M&T), llevó a cabo un programa de trabajo para estandarizar esquemas de extracción simple y secuencial para la determinación de metales traza extraíbles en suelo y sedimento. El desarrollo de este programa empezó en 1987 y fue reconocido por ser un punto de inflexión en el uso de estos esquemas en Europa [Salomons, 1993; Quevauviller 1998a].

La estrategia de trabajo desarrollada por el BCR en este programa se ha descrito en detalle por Quevauviller [Quevauviller y col., 1993; Quevauviller y col., 1994]. En esta estrategia se incluía en primer lugar el diseño de los procedimientos estándar de extracción simple y secuencial para el análisis de suelos y sedimentos, seguido de la realización de ensayos interlaboratorios de estos procedimientos de extracción y, por último, la preparación de muestras de referencia certificadas para los metales extraíbles. Estos trabajos culminaron con la propuesta de un procedimiento de extracción secuencial, el denominado **método BCR de extracción secuencial**, que consiste en 3 extracciones sucesivas empleando ácido acético, cloruro de hidroxilamonio y peróxido de hidrógeno combinado con acetato amónico, obteniendo la fracción intercambiable, la reducible y la oxidable, respectivamente. Además, fue elaborado un sedimento de referencia (CRM-601) con el objetivo de que el método

podiera ser validado en cada laboratorio independiente [López-Sánchez y col., 1998; Quevauviller, 1998b]. Todo este procedimiento de extracción secuencial se explicará con detalle en el Capítulo IV de esta Tesis Doctoral; más concretamente, en el apartado referente a la metodología de especiación en sedimentos.

En un trabajo posterior, Quevauviller realizó una serie de recomendaciones importantes a tener en cuenta en el procedimiento experimental del método BCR [Quevauviller y col., 1997]:

- Las disoluciones de calibración deben hacerse con las disoluciones extractantes empleadas en cada paso de extracción.
- Con cada lote de extractos se analizará una muestra de blanco; es decir, se debe realizar el mismo procedimiento en un recipiente que no contenga sedimento.
- El sedimento debe estar continuamente en suspensión durante la extracción. Si esto no ocurre, la velocidad de agitación debe adaptarse para asegurar una suspensión continua de la mezcla.

Más tarde, se propusieron algunas mejoras a este método de extracción secuencial y se hicieron una serie de recomendaciones acerca de las distintas variables identificadas como fuentes potenciales de incertidumbre [Rauret y col., 1999; Sahuquillo y col., 1999]. Una de las recomendaciones que se presentó fue la siguiente: como control interno del procedimiento, se recomienda que el residuo del paso 3º se digiera en agua regia y la cantidad total de metal extraído (suma de la fase 1 + fase 2 + fase 3 + residuo) se compare con el resultado de la digestión con agua regia de una muestra separada de 1 g del sedimento original. El residuo del paso 3º debe transferirse a un recipiente de digestión adecuado con aproximadamente 3 mL de agua y debe digerirse siguiendo el protocolo ISO-11466 [ISO, 1994]. El mismo procedimiento debe usarse para la digestión con agua regia del sedimento original [Adamo y Zampella, 2008].

En este contexto, Pueyo y colaboradores describen la preparación de un nuevo material de referencia de sedimento BCR-701, preparado a partir de muestras de sedimento recogidas en el lago Orta en Italia [Pueyo y col., 2001]. En este trabajo se recogen todas las recomendaciones elaboradas en los trabajos precedentes, tanto para la aplicación del protocolo de extracción secuencial BCR como para la norma ISO-11466, presentándose los respectivos procedimientos. Esta muestra de referencia ha sido extensamente utilizada en estudios de especiación metálica en sedimentos [The Cuong y Obbard, 2006; Pueyo y col., 2008; Díaz-de Alba y col., 2011; Martínez-Fernández y col., 2011], pero un estudio reciente ha expuesto que sería muy

recomendable la extensión y utilización de nuevos materiales de referencia, los cuales engloben un rango más amplio de metales certificados, con el objetivo de abarcar una mayor variedad de suelos y sedimentos comúnmente analizados [Sutherland, 2010].

Hay que tener en cuenta que todas las extracciones selectivas realizadas en este procedimiento, dan como resultados especies separadas desde un punto de vista operacional; es decir, la separación de las distintas especies depende del esquema analítico empleado. Así pues, a lo largo de los años, el método de extracción secuencial en tres etapas, conocido como BCR, ha sido ampliamente validado y aplicado para estudios de especiación metálica en muestras de sedimentos de río, mar, estuario y arroyos, siendo bastante fiables en este campo [Baig y col., 2009; Nemati y col., 2011; Reis y col., 2013]. Por tanto, ha conseguido establecerse como método de referencia internacional, y será el que se aplique en esta Tesis.

I.6. Legislación ambiental

La legislación ambiental o derecho ambiental abarca un complejo conjunto de tratados, convenios, estatutos, reglamentos, y el derecho común, con el fin de regular la interacción de la humanidad y el resto de los componentes biofísicos o el medio ambiente natural, y reducir así los impactos de la actividad humana sobre el medio natural.

No es fácil desconocer los sucesos de contaminación que con lamentable frecuencia se producen en el medio ambiente. Por ejemplo, cualquiera puede recordar algún accidente que haya causado un vertido industrial de grandes dimensiones o una marea negra de considerable extensión procedente de buques; en cualquiera de los casos, con efectos perjudiciales que no sólo afectan al medio en sí, a las aguas, sino a todos los recursos naturales que a partir de éstas se interrelacionan, y por ende, al entorno humano que depende de estos recursos. Menos sonora, pero quizás con efectos más perjudiciales por su constancia, es la contaminación que, sin provenir de accidentes, tiene lugar a consecuencia del desarrollo normal de las actividades que están en directa conexión con el mar o la costa –vertidos industriales, transporte marítimo, actividades de explotación de recursos, entre otras.

Ante tales agresiones, los agentes sociales han reaccionado y el medio ambiente es hoy considerado como un bien digno de la mayor protección, también en su vertiente jurídica. Las leyes relacionadas con el control de la contaminación y la remediación, suelen centrarse en los distintos medios (aire, agua -superficiales, subterráneas y

océanos- y suelo) con el fin de controlar las emisiones de los contaminantes en el medio ambiente, así como las operaciones de limpieza necesarias en caso de excederse las emisiones permitidas. Por otra parte, las leyes pueden referirse a la conservación y gestión de los recursos ambientales. Éstas se centran fundamentalmente en proponer directrices y limitaciones sobre la conservación, alteración y uso de los principales recursos naturales (bosques, yacimientos minerales, zonas de alto valor ecológico o arqueológico, entre otros).

En el caso del medio marino, su carácter transfronterizo hace que desde las estructuras internacionales se le preste una especial atención a su protección. La Unión Europea empezó hace varias décadas a aplicar una política en ese sentido, a través de la cual se ha pretendido armonizar la protección de este medio en todos los Estados comunitarios. Desde la perspectiva interna, tanto a nivel estatal como autonómico, la preocupación por proteger el mar es patente. Fruto de tales inquietudes se produce la aparición de una normativa reguladora de tal protección que, por las razones expuestas, es de la más diversa procedencia abarcando los ámbitos internacional, comunitario, estatal y autonómico. Dicha normativa se centra en tres principales líneas u orientaciones [Calero, 1995; Jaquenod de Zsögön, 2005]:

- Se configura como valor prevalente la necesidad de conservar el medio ambiente litoral. De esta forma, se toma conciencia de que los asentamientos y actividades humanas no siempre han sido respetuosos con las características naturales de la costa. Se han producido degradaciones que en el futuro es preciso evitar, con el fin de que las costas y los mares conserven su equilibrio ecológico. Esta conciencia ecológica se ha generalizado entre las sociedades occidentales y existe una acentuada sensibilidad por los problemas del medio ambiente, aunque no siempre se consiguen cotas de eficacia, en los medios de conservación y protección, acordes con esta sensibilización social.
- Se aspira a que la costa sea de uso público, suprimiendo o restringiendo toda privatización, todo derecho o todo uso que impida a la colectividad el acceso y disfrute de este espacio público. Se conecta además esta aspiración con el principio de igualdad de todos los hombres ante el acceso a los bienes públicos y con los objetivos sociales sobre la calidad de vida y disfrute del medio ambiente.
- Todo ello, sin excluir el aprovechamiento de los recursos de la costa ni aquellas utilidades exigibles por otros intereses públicos. Se tratará por tanto de compaginarlas encontrando el adecuado equilibrio, de modo que la explotación económica de los recursos o las exigencias de la navegación o de la defensa no afecten, o lo hagan en grado mínimo, ni a las condiciones naturales del litoral ni a su susceptibilidad de uso público.

Existe un marco legislativo que viene dado desde la Unión Europea al que se deben adaptar todos los países miembros de la misma y que hace referencia a la calidad de las aguas y al uso que de ellas se hace.

La Directiva Marco de Aguas (DMA) de la Unión Europea (Directiva 60/2000 ó Directiva 2000/60/CE, de 23 de octubre de 2000, publicada en el DOCE núm. L327/1, de 22 de diciembre de 2000) es una norma del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea por la que se establece un marco comunitario para la protección y la gestión del agua. En una primera etapa, los Estados miembros deben identificar y analizar las aguas europeas, por cuencas y demarcaciones hidrográficas. A continuación, deben adoptar planes de gestión y programas de medidas adaptados a cada masa de agua.

De esta forma, la Unión Europea (UE) establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, para la protección de las aguas continentales, costeras y de transición. La citada Directiva Marco persigue varios objetivos, especialmente la prevención y la reducción de la contaminación, la promoción del uso sostenible del agua, la protección del medio ambiente, la mejora de la situación de los ecosistemas acuáticos y la atenuación de los efectos de las inundaciones y de las sequías.

Los principales objetivos de esta Directiva se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Prevenir todo deterioro adicional y proteger y mejorar el estado de los ecosistemas acuáticos y, con respecto a sus necesidades de agua, de los ecosistemas terrestres y humedales directamente dependientes de los ecosistemas acuáticos.
- Promover un uso sostenible del agua basado en la protección a largo plazo de los recursos hídricos disponibles.
- Tener por objeto una mayor protección y mejora del medio acuático, entre otras formas mediante medidas específicas de reducción progresiva de los vertidos, las emisiones y las pérdidas de sustancias prioritarias, y mediante la interrupción o la supresión gradual de los vertidos, las emisiones y las pérdidas de sustancias peligrosas prioritarias.
- Garantizar la reducción progresiva de la contaminación del agua subterránea y evitar nuevas contaminaciones.

- Contribuir a paliar los efectos de las inundaciones y sequías.

Además, la DMA establece como objetivo para el año 2015 conseguir un “buen estado” de las aguas europeas y que el “uso sostenible del agua” esté asegurado en toda Europa. Para alcanzar estas metas, la norma requiere la cooperación entre los distintos estados miembros, así como la participación de las entidades locales y ONGs en las actividades de gestión del agua. Además, reafirma el principio según el cual “el que contamina, paga”.

En el Artículo 2 de esta normativa se incluyen 41 definiciones de términos relacionados con los ecosistemas acuáticos, de las cuales se destacan las siguientes:

- **Aguas superficiales:** son las aguas continentales, excepto las aguas subterráneas; las aguas de transición y las aguas costeras, y en lo que se refiere al estado químico, también las aguas territoriales.
- **Aguas subterráneas:** Todas las aguas que se encuentran bajo la superficie del suelo en la zona de saturación y en contacto directo con el suelo o el subsuelo.
- **Aguas continentales:** todas las aguas quietas o corrientes en la superficie del suelo y todas las aguas subterráneas situadas hacia tierra desde la línea que sirve de base para medir la anchura de las aguas territoriales.
- **Aguas de transición:** masas de agua superficial próximas a la desembocadura de los ríos que son parcialmente salinas como consecuencia de su proximidad a las aguas costeras, pero que reciben una notable influencia de flujos de agua dulce.
- **Sustancias peligrosas:** las sustancias o grupos de sustancias que son tóxicas, persistentes y pueden causar bioacumulación, así como otras sustancias o grupos de sustancias que entrañan un nivel de riesgo análogo.
- **Sustancias prioritarias:** sustancias que presentan un riesgo significativo para el medio acuático o a través de él. Entre estas sustancias se encuentran las “sustancias peligrosas prioritarias”, las cuales se encuentran identificadas y enumeradas en el Anexo X de la DMA.
- **Contaminante:** cualquier sustancia que pueda causar contaminación, en particular las sustancias enumeradas en el Anexo VIII de esta Directiva.
- **Contaminación:** la introducción directa o indirecta, como consecuencia de la actividad humana, de sustancias o calor en la atmósfera, el agua o el suelo, que puedan ser perjudiciales para la salud humana o para la calidad de los ecosistemas acuáticos, o de los ecosistemas terrestres que dependen directamente de ecosistemas acuáticos, y que causen daños a los bienes materiales o deterioren o dificulten el disfrute y otros usos legítimos del medio ambiente.

Como se ha citado, en el Anexo VIII de la Directiva Marco de Agua se recoge el listado de los principales contaminantes presentes en los ecosistemas acuáticos.

ANEXO VIII DE LA DMA (Directiva 2000/60/CE)
LISTA INDICATIVA DE LOS PRINCIPALES CONTAMINANTES

1. Compuestos organohalogenados y sustancias que puedan dar origen a compuestos de esta clase en el medio acuático.
2. Compuestos organofosforados.
3. Compuestos organoestánicos.
4. Sustancias y preparados, o productos derivados de ellos, cuyas propiedades cancerígenas, mutágenas o que puedan afectar a la tiroides, esteroideogénica, a la reproducción o a otras funciones endocrinas en el medio acuático o a través del medio acuático estén demostradas.
5. Hidrocarburos persistentes y sustancias orgánicas tóxicas persistentes y bioacumulables.
6. Cianuros.
7. Metales y sus compuestos.
8. Arsénico y sus compuestos.
9. Biocidas y productos fitosanitarios.
10. Materias en suspensión.
11. Sustancias que contribuyen a la eutrofización (en particular nitratos y fosfatos).
12. Sustancias que ejercen una influencia desfavorable sobre el balance de oxígeno (y computables mediante parámetros tales como DBO o DQO).

El Artículo 16 establece la necesidad de una estrategia de lucha contra la contaminación del agua, una de cuyas actuaciones es el establecimiento de una lista de sustancias prioritarias que constituiría, una vez aprobada, el Anexo X de la Directiva (art.16.11). En consecuencia, el texto original de la Directiva, publicado en diciembre de 2000, dejaba este Anexo pendiente de desarrollo. Fue en la Decisión nº 2445/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de noviembre de 2000 (DOCE núm. L331/1, de 15 de diciembre de 2001) donde se aprobó la primera lista de sustancias o grupos de sustancias prioritarias en el ámbito de la Política de Aguas, clasificadas en orden prioritario, cuyas Normas de Calidad Ambiental (NCA) fueron establecidas en la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008 (DOUE núm. L348/84, de 24 de diciembre de 2008) para las 33 sustancias prioritarias identificadas en la Decisión nº 2455/2001/CE y otros 8 contaminantes que ya estaban regulados en la Unión. La posterior Directiva 2013/39/UE ha modificado las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias denominadas prioritarias en el ámbito de la política de aguas. En ella se ha efectuado una revisión de la lista de sustancias prioritarias anteriores y se ha modificado mediante la

identificación de nuevas sustancias para acciones prioritarias a escala de la Unión, además del establecimiento de NCA para dichas sustancias identificadas recientemente y la revisión de las NCA para algunas sustancias existentes en función del progreso científico y el establecimiento de NCA de la biota para algunas sustancias prioritarias existentes y las sustancias identificadas recientemente. En la Tabla I.9 se muestra un extracto de la lista de sustancias prioritarias del Anexo X relativo a metales pesados. No obstante, la Comisión debe seguir revisando la lista de sustancias prioritarias, otorgando prioridad a aquellas sustancias que puedan ser objeto de medidas sobre la base de criterios acordados que demuestren la existencia de riesgo para el medio acuático o a través de él, y debe presentar propuestas al respecto según resulte adecuado.

Tabla I.9. Extracto del Anexo X de la lista de sustancias prioritarias relativo a metales pesados (Directiva 2013/39/UE)

Número	Número CAS ⁽¹⁾	Número UE ⁽²⁾	Nombre de la sustancia prioritaria ⁽³⁾	Sustancia peligrosa prioritaria
(6)	7440-43-9	231-152-8	Cadmio y sus compuestos	X
(20)	7439-92-1	231-100-4	Plomo y sus compuestos	
(21)	7439-97-6	231-106-7	Mercurio y sus compuestos	X
(23)	7440-02-0	231-111-14	Níquel y sus compuestos	
(30)	No aplicable	No aplicable	Compuestos de tributilestaño	X ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ CAS: Servicio de resúmenes químicos (*Chemical Abstracts Service*)

⁽²⁾ Número UE: Número de registro del Catálogo Europeo de Sustancias Químicas Comercializadas (EINECS) o de La Lista Europea de Sustancias Químicas Notificadas (ELINCS)

⁽³⁾ Cuando se hayan seleccionado grupos de sustancias, a menos que estén explícitamente señalados, determinados representantes típicos se definen en el contexto de la fijación de normas de calidad ambiental

⁽⁴⁾ Con inclusión del catión de tributilestaño (CAS 36643-28-4)

Progresando en la estrategia de protección de las aguas, se aprobó a nivel estatal el Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas (BOE núm. 19, de 22 de enero de 2011). Tal Real Decreto tiene como finalidad trasponer todos los aspectos contenidos en la Directiva 2008/105/CE, e incorpora al derecho español el apartado 1.2.6 del Anexo V de la Directiva 2000/60/CE, en el cual se define el procedimiento para el establecimiento de Normas de Calidad Ambiental (NCA) de contaminantes en aguas, sedimento o biota. En el citado Real Decreto se propone como objetivo "establecer NCA para las

sustancias prioritarias y para otros contaminantes de riesgo en el ámbito europeo, y para las sustancias preferentes de riesgo en el ámbito estatal. Asimismo, incorpora las especificaciones técnicas del análisis químico y del seguimiento del estado de las aguas, y fija el procedimiento para calcular las NCA de los contaminantes con objeto de conseguir un buen estado de las aguas”.

En conclusión, la aplicación práctica de la DMA supone un complejo reto para los Estados miembros de la Unión Europea, siendo necesaria una aplicación coordinada y homogénea, de manera que los Estados miembros y la Comisión Europea interpreten de la misma forma sus pautas y criterios. Los diferentes artículos de la Directiva establecen numerosas tareas y actividades que definen su proceso de implementación, denominado proceso de planificación. La Directiva Marco del Agua (DMA) es una normativa europea que requiere a los Estados miembros que en 2015 todas sus aguas tengan, al menos, un 'buen estado ecológico y químico'. Este objetivo es sumamente ambicioso y, en la práctica, significa dejar de considerar a los ríos como 'canales que transportan agua', o los acuíferos como 'almacenes de agua' que no tienen ninguna relación con ríos y humedales.

De forma paralela, en 2010 entró en vigor la nueva Ley 41/2010, de 29 de diciembre, de Protección del Medio Marino (BOE núm. 317, de 30 de diciembre de 2010), que incorpora al derecho español la Directiva Marco sobre Estrategia Marina (Directiva 2008/56/CE), suponiendo la mayor ampliación territorial del Derecho ambiental comunitario. Esta nueva Directiva establece un marco de acción comunitario para la política del medio marino.

Esta Directiva considera que “las aguas marinas, bajo la soberanía y jurisdicción de los Estados miembros de la Unión Europea, comprenden las aguas del Mar Mediterráneo, el Mar Báltico, el Mar Negro y el Noroeste del Océano Atlántico, incluidas las aguas alrededor de las Azores, Madeira y las Islas Canarias”. Además, sostiene que “el medio marino es un patrimonio muy valioso que ha de ser protegido, conservado y, cuando sea viable, rehabilitado, con el objetivo final de mantener la biodiversidad y preservar la diversidad y el dinamismo de unos océanos y mares que sean limpios, sanos y productivos”, y que “la consecución de estos objetivos requiere la instauración de un marco legislativo transparente y que contribuya a la coherencia entre las distintas políticas con el fin de fomentar la integración de las inquietudes medioambientales en otras políticas, tales como la política pesquera común, la política agrícola común y otras políticas comunitarias pertinentes”.

“La Directiva marco sobre la estrategia marina establece que sus regulaciones se aplicarán a las aguas costeras con arreglo a la definición de la Directiva Marco del Agua, el lecho marino y el subsuelo situados más allá de la línea de base que sirve para

medir la anchura de las aguas territoriales y que se extienden hasta el límite exterior de la zona en que un Estado miembro de la Unión Europea ejerce soberanía o jurisdicción de conformidad con la Convención de las Naciones Unidas sobre Derecho del Mar”.

El principal objetivo de la Directiva sobre Estrategia Marina es conseguir unas aguas marinas en un buen estado ecológico para 2020, lo que se logrará mediante el establecimiento de regiones y subregiones marinas, que gestionarán los Estados miembros de forma integrada basándose en criterios ecológicos.

Al elaborar las estrategias sobre las aguas de cada región marina, los Estados miembros deberán cooperar estrechamente. Cada estrategia consiste en un plan de acción que se aplicará en varias fases. Los Estados miembros deberán evaluar primero el estado ecológico de sus regiones marinas respectivas y las principales presiones que sufren las mismas, determinar después lo que se puede considerar un buen estado ecológico y establecer a continuación objetivos, indicadores y programas de seguimiento. Los programas de medidas deben elaborarse antes de 2015 para conseguir un buen estado ecológico para 2020.

Una contribución importante del Parlamento Europeo a la Directiva incluye la obligación de los Estados miembros de establecer zonas marinas protegidas. Los Estados miembros que compartan una región marina deberán cooperar para velar por que sus estrategias marinas sean coherentes y estén coordinadas. Deben también hacer todo lo posible para coordinar sus actividades con países no pertenecientes a la UE en la misma región marina, incluso mediante convenios marinos regionales.

En Andalucía, en 2010 se aprobó la Ley 9/2010 de Aguas de Andalucía (BOJA núm. 155, de 9 de agosto de 2010), que viene a desarrollar el artículo 197.3 del Estatuto de Autonomía de Andalucía, en el que se establece que “los poderes públicos de Andalucía protegerán el ciclo integral del agua y promoverán su uso sostenible, eficiente y responsable de acuerdo con el interés general”. La **Ley de Aguas de Andalucía** contiene una regulación de la planificación hidrológica para la que, en el ámbito estrictamente andaluz, se fijan una serie de objetivos relativos a las finalidades establecidas por la Directiva Marco de Aguas, entre los que destaca garantizar los caudales o demandas ambientales, y el orden de prioridad de uso para las actividades económicas, que se establecerá en función de su sostenibilidad, el mantenimiento de la cohesión territorial y el mayor valor añadido en términos de creación de empleo y generación de riqueza para Andalucía.

Para garantizar el cumplimiento de la normativa a nivel andaluz, en enero de 2005 se constituyó la Agencia Andaluza del Agua, organismo autónomo de carácter administrativo de la Junta de Andalucía, adscrito a la Consejería de Medio Ambiente,

competente en materia de aguas. Años más tarde, en enero de 2009, se aprobaron los estatutos de la Agencia Andaluza del Agua, en el Decreto 2/2009, de 7 de enero (BOJA núm. 6, de 12 de enero de 2009), comenzando a abordar en ese momento sus competencias. Según dicho Decreto, le corresponde a la Agencia el ejercicio de las competencias de la Comunidad Autónoma de Andalucía en materia de aguas y obras hidráulicas. La Agencia Andaluza del Agua desapareció en 2011, tras la reorganización del sector público realizada por la Junta de Andalucía, quedando integrada sus competencias en la Secretaría General de Medio Ambiente y Agua de la Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, actualmente Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Por el Decreto 4/2013, de 9 de septiembre (BOJA núm. 177 de 10 de septiembre de 2013), tiene lugar una reestructuración de Consejerías, por lo que es la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio a la que le corresponden las competencias en materia de medio ambiente, agua, planificación, ordenación y desarrollo territorial y urbanismo que venía ejerciendo la Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente. Además, se adscribe a la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio la Agencia de Medio Ambiente y Agua de Andalucía.

Todas estas políticas de protección de los sistemas acuáticos remarcaban la importancia que tiene la conservación de la calidad de las aguas, su control y su estudio. Es por ello, que esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de la contaminación en aguas por metales pesados, como sustancias de gran interés medioambiental.

Capítulo II.

Desarrollo de una membrana líquida de volumen para el análisis de plomo en agua de mar

Resumen

Generalmente, para llevar a cabo la determinación de especies químicas que se encuentran a niveles de trazas o ultratrazas, suele ser necesaria una etapa previa de concentración. La implementación de técnicas de concentración, previas a la medición, evita el empleo de instrumental sofisticado de alto coste y, en muchos casos, permite conseguir niveles de concentración superiores a los límites de detección que presentan determinados equipos. La determinación de niveles de metales pesados en aguas naturales es un área de estudio que ha demostrado ser de un gran interés desde el punto de vista medioambiental. En este sentido, las membranas líquidas han manifestado grandes ventajas en cuanto a su aplicación en la preconcentración y separación de iones metálicos en muestras acuosas medioambientales [Irigoyen y col., 2006].

En este capítulo se desarrolla un método para la determinación de Pb(II) a niveles de trazas basado en la utilización de una membrana líquida de volumen, que permite su aplicación en aguas naturales, especialmente en aguas de carácter salino. Este nuevo método permite realizar los procesos de separación y/o preconcentración del metal de un modo continuo, y su posterior análisis mediante técnicas espectrofotométricas convencionales, como la espectrofotometría de absorción atómica. Para facilitar el transporte del ión metálico a través de la membrana líquida propone el empleo de la tiosemicarbazona 2 - hidroxibenzaldehído-N-etiltiosemicarbazona (2-HBET) como agente transportador.

Capítulo II. A

Introducción

II.A.1. Las membranas líquidas: procesos de extracción y reextracción

El avance tecnológico, unido a un mayor conocimiento acerca de la peligrosidad de los metales pesados en los ecosistemas acuáticos, aún en bajas concentraciones, ha dado lugar a un amplio desarrollo de nuevas técnicas destinadas a la separación y determinación de estos contaminantes.

Mediante el empleo de la técnica de extracción líquido-líquido convencional, el analito es transferido desde la muestra inicial hacia el seno de un disolvente orgánico. Así, se consigue separar el analito objeto de estudio del resto de las especies interferentes presentes en la muestra inicial, evitando el efecto matriz durante la determinación química que puede presentarse en algunas muestras complejas. Al mismo tiempo, tiene lugar un proceso de preconcentración, al pasar de un volumen inicial a otro inferior, solucionándose así las limitaciones derivadas de la falta de sensibilidad en algunos instrumentos de análisis. No obstante, la extracción líquido-líquido no resulta ser suficiente en muchos casos, ya que determinados disolventes orgánicos no son adecuados para ser introducidos directamente en algunos equipos, como sucede con los espectrómetros de absorción atómica. Por eso, se suele utilizar una segunda etapa o proceso de reextracción, mediante el cual el analito se vuelve a transferir desde el medio orgánico a un medio acuoso compatible con la técnica de análisis a utilizar.

Las membranas líquidas son una alternativa a estos dos procesos secuenciales, pues permiten combinar los procesos de extracción y reextracción en un único paso.

A continuación se expondrán los conceptos, características, ventajas y limitaciones de los procesos de extracción y reextracción, para posteriormente describir los sistemas de membranas líquidas.

II.A.1.1. Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido es una técnica de separación basada en la distribución de un soluto entre dos fases líquidas inmiscibles. El proceso está regido por la *ley de distribución*, propuesta inicialmente por Berthelot y Jungfleisch y desarrollada por Nernst. Esta ley establece que en el equilibrio, a presión y temperatura constantes, la relación de concentraciones de un soluto entre dos fases inmiscibles es constante [Valcárcel y Gómez, 1990].

La composición de las fases utilizadas junto con las condiciones técnicas del procedimiento son los principales factores determinantes de la eficacia del proceso de extracción. Esta operación se suele realizar entre una disolución acuosa (fase acuosa) y otro disolvente inmiscible con el agua (fase orgánica) en un embudo de decantación. Además, se pueden emplear combinaciones de dos o más disolventes orgánicos inmiscibles con el agua. La posición relativa de ambas fases (zona superior o inferior) depende de la relación de densidades.

La *fase acuosa* suele ser la que contiene el soluto/s a separar además de otras sustancias debidas a la matriz de la muestra, al tratamiento previo de ésta, o bien añadidas intencionadamente con alguna finalidad, como puede ser mejorar la eficacia del proceso extractivo. A veces, se disuelve en esta fase una sustancia que provoca la extracción del analito o analitos; esta sustancia es llamada *agente extractante*.

La *fase orgánica*, que es inmiscible con la fase acuosa, se denomina según la IUPAC, *extractante*. El *extractante* permite la separación de los solutos mediante contacto directo con la fase acuosa, que inicialmente los contiene; esta fase puede ser un único disolvente orgánico o una mezcla de disolventes. En muchos casos, se añade a la fase orgánica una sustancia que coadyuva a la extracción, en este caso a la sustancia se le denomina *agente extractante*, y es el responsable principal de la transferencia del soluto desde la fase acuosa hacia la fase orgánica por solvatación, formación de complejos o formación de aductos previos a la extracción. Es conveniente, para favorecer el proceso de extracción, que el *agente extractante* esté en exceso, pero debe controlarse su concentración porque un exceso demasiado elevado puede provocar reacciones secundarias no deseadas. A veces, el *agente extractante* se añade a la fase orgánica disuelto en un disolvente miscible con ella, por lo que al disolvente que contiene el *agente extractante* se denomina en este caso *diluyente*; en general el *diluyente* no suele intervenir directamente en la extracción, su misión es mejorar las propiedades físicas, como el poder disolvente, densidad o viscosidad de la fase orgánica, o las propiedades químicas, como la selectividad. Principalmente, la eficiencia del extractante depende de la afinidad de éste por el soluto a extraer, de la relación de volúmenes de las dos fases, del número de extracciones y de la insolubilidad del agente extractante (en caso de emplearse) en la fase donde inicialmente esté el soluto a transferir [Cámara y col., 2004; Rydberg y col., 2004; Kislik 2012].

El *disolvente* o disolventes usado/s como fase orgánica debe/n presentar algunas características que faciliten la extracción [Cámara y col., 2004; Couper y col., 2012]:

- Que no sea miscible con el otro disolvente. El disolvente de extracción debe ser inmiscible con la disolución a extraer. El agua o una disolución acuosa suele ser

uno de los disolventes implicados, mientras que el otro disolvente es un disolvente orgánico.

- Que el componente deseado sea más soluble en el disolvente de extracción que en el disolvente original.
- Que el resto de componentes no sean solubles en el disolvente de extracción, para una mayor selectividad. Es decir, que el disolvente presente una alta selectividad por el analito en cuestión.
- En caso necesario, que sea suficientemente volátil, de manera que se pueda eliminar fácilmente del producto extraído mediante destilación o evaporación.
- Que no sea tóxico ni inflamable, aunque desgraciadamente hay pocos disolventes que cumplan los dos criterios.
- Que presente buena estabilidad química y no forme emulsiones.
- Que tenga baja viscosidad y una tensión interfacial moderadamente baja.

En la Tabla II.A.1 se muestran los disolventes orgánicos más empleados en extracción líquido-líquido, y en la Tabla II.A.2 se detallan los agentes extractantes y los disolventes orgánicos más utilizados en la extracción líquido-líquido de metales.

Tabla II.A.1. Disolventes orgánicos más utilizados en extracción líquido-líquido y sus características principales [tabla ampliada de Cámara y col., 2004; <http://www.sigmaaldrich.com/>]

Nombre	Fórmula	Densidad (g mL ⁻¹)	Punto de ebullición (°C)	Peligrosidad
Disolventes de extracción menos densos que el agua				
Acetato de etilo	CH ₃ COOCH ₂ CH ₃	0,9003	78	Inflamable, irritante
Benceno	C ₆ H ₆	0,8765	80	Inflamable, tóxico, carcinógeno
Ciclohexano	C ₆ H ₁₂	0,7785	81	Muy inflamable, nocivo, irritante
Ciclohexanol	C ₆ H ₁₂ O	0,9624	161	Nocivo, irritante
Ciclohexanona	C ₆ H ₁₀ O	0,9478	156	Inflamable, nocivo
Dietiléter	(CH ₃ CH ₂) ₂ O	0,7138	35	Muy inflamable, tóxico
Hexano	C ₆ H ₁₄	0,6603	69	Inflamable, irritante, tóxico
n-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	0,8136	157	Nocivo, irritante
Metilisobutilcetona (MIBK)	C ₆ H ₁₂ O	0,7978	117	Inflamable, nocivo, irritante
n-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	0,8240	195	Inflamable, irritante

Tabla II.A.1 (cont.). Disolventes orgánicos más usados en extracción líquido-líquido y sus características principales [tabla ampliada de Cámara y col., 2004; <http://www.sigmaaldrich.com/>]

Nombre	Fórmula	Densidad (g mL ⁻¹)	Punto de ebullición (°C)	Peligrosidad
Disolventes de extracción menos densos que el agua				
Tolueno	C ₆ H ₅ CH ₃	0,8669	111	Inflamable, nocivo, irritante
Disolvente de extracción más densos que el agua				
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	1,3260	41	Irritante, tóxico
Cloroformo	CHCl ₃	1,4832	61	Tóxico
Tetracloruro de carbono	CCl ₄	1,5940	77	Tóxico

Tabla II.A.2. Principales agentes quelatantes y disolventes orgánicos empleados en extracción líquido-líquido de metales [Cámara y col., 2004]

Agente quelatante	Disolvente orgánico	Metales/metaloideos extraídos
8-hidroxiquinoleína (oxina)	Cloroformo	Ag, Al, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, Hg, In, La, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, Ti, Tl, U, V, W, Zn, Zr
Difeniltiocarbazona (ditizona)	Cloroformo, nitrobenzeno	Ag, Au, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, Hg, In, Mn, Ni, Pb, Pd, Pt, Sn, Te, Tl, Zn
Dietilditiocarbamato sódico	Cloroformo, diisobutilcetona	Ag, As, Au, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, Hg, In, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Sn, Te, Ti, Tl, U, V, W, Zn
Pirrolidinditiocarbamato amónico	Metilisobutilcetona, diisobutilcetona, tetracloruro de carbono	Ag, As, Au, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, Ge, Hg, In, Ir, Mn, Mo, Nb, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Sb, Sn, Te, Ti, Tl, U, V, W, Zn
Dietilamonio-dietilditiocarbamato	1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano, cloroformo	Ag, As, Au, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, Ge, Hg, In, Ir, Mn, Mo, Nb, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Sb, Sn, Te, Ti, Tl, U, V, W, Zn
1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN)	Metilisobutilcetona	Ag, Bi, Cd, Ce, Co, Cu, Fe, Ga, Hg, In, Ir, La, Mn, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Sn, Ti, U, V, Zn, Zr
Sal amónica de nitroso-fenil-hidroxilamina (cupferrón)	Cloroformo	Al, Bi, Ce, Co, Cu, Fe, Ga, In, Mo, Ni, Pb, Pd, Sb, Sn, Ti, U, Sn

Una vez se ha realizado la extracción y el soluto ha quedado repartido entre las dos fases, la fase orgánica donde se encuentran el extractante y el soluto extraído se denomina *extracto* (considerando que la transferencia de soluto tiene lugar de la fase acuosa a la fase orgánica para su separación y/o preconcentración), mientras que la fase de donde se ha extraído el soluto y, por tanto, la concentración de éste es menor, se denomina *refinado*.

Para lograr una separación lo más factible posible de la sustancia de interés, hay que tener en cuenta aspectos adicionales como el pH de la fase acuosa, la concentración del agente extractante, la relación de volúmenes entre las fases orgánica/acuosa, la intensidad y el tiempo de agitación, el tiempo de separación de las fases y la temperatura.

La extracción puede producirse tanto por un proceso físico como químico. En el primer caso, la extracción se produce por difusión o por solubilización del soluto en la fase orgánica. En cambio, en un proceso químico se producen reacciones químicas entre el soluto y el extractante.

Desde el punto de vista operativo, la extracción líquido-líquido puede realizarse mediante tres tipos generales de técnicas: *simple*, que consiste en establecer un único estado de equilibrio entre la fase acuosa y la fase orgánica; *repetitiva*, que consiste en poner en contacto repetidas veces la fase que contiene la sustancia a separar con porciones frescas de la fase orgánica; y en *contracorriente*, en la que ambas fases se mueven en direcciones opuestas y están en contacto continuo [Valcárcel y Gómez, 1990].

La técnica de extracción líquido-líquido tiene numerosas aplicaciones en el campo de la Química Analítica [Valcárcel y Gómez, 1990; Clement y Hao, 2012]:

- **Como técnica de separación.** Éste es quizás su principal campo de aplicación. La extracción líquido-líquido puede emplearse como una potente técnica de separación con aplicaciones muy diversas, entre las que se puede destacar la separación y purificación de una gran variedad de especies, como antibióticos, productos naturales, metales, proteínas o hidrocarburos, entre otros.
- **Para la concentración de trazas.** Cuando el método analítico a emplear no es suficientemente sensible, se puede aplicar la extracción líquido-líquido como etapa previa de preconcentración. Para ello, debe tratarse un volumen de disolución acuosa (con la especie de interés) con un volumen mucho menor de fase orgánica y transferirse la especie a esta última. Como consecuencia, el analito aumentará su concentración al pasar a una fase de menor volumen.

- **Para realizar estudios teóricos de equilibrios en disolución.** La utilización de esta técnica permite también determinar constantes de equilibrio, tales como constantes de acidez, constantes de estabilidad de complejos y constantes de productos de solubilidad.

II.A.1.2. Reextracción

La reextracción se lleva a cabo en determinados casos una vez realizada la extracción y consiste en la transferencia de la especie a analizar desde la fase orgánica, en la que se encuentra después de la extracción, a un medio más idóneo donde pueda ser determinada con posterioridad. Para ello, se debe poner en contacto el extracto orgánico con una disolución acuosa de diferente naturaleza que la inicial, de forma que la especie de interés se transfiera completamente a la nueva disolución acuosa. Las condiciones que deben emplearse para que dicho proceso se produzca dependerán de la extracción específica realizada previamente, ya que las condiciones que favorecen la extracción son opuestas a las que favorecen la reextracción [Valcárcel y Silva, 1984].

Este proceso, de gran utilidad analítica, ha sido aplicado fundamentalmente para los siguientes fines [Valcárcel y Silva, 1984]:

- **Para aumentar la selectividad** del propio proceso de extracción líquido-líquido, aplicándolo a la eliminación de las especies interferentes extraídas junto con el analito que se pretende determinar, o simplemente separando la especie de interés del resto de la fase orgánica.
- **Para eliminar el exceso de reactivo de la fase orgánica.** Un exceso del agente extractante en la fase orgánica, usado para favorecer la extracción del analito, puede ser motivo de interferencias al aplicar el método instrumental de determinación del analito.
- **Para cambiar la naturaleza del disolvente.** Su principal motivo es que, a veces, el disolvente orgánico en el que se encuentra el analito no puede ser utilizado con una determinada técnica. Otra razón es la de aumentar la seguridad laboral del analista cuando el empleo de ciertos disolventes conlleva la producción de sustancias tóxicas durante el análisis.

Esta técnica de separación y/o preconcentración basada en los procesos de extracción/reextracción posee numerosas ventajas aunque presenta algunos inconvenientes [Bonfant y col., 2002; Clement y Hao, 2012]:

- Supone una manipulación de muestras y reactivos relativamente alta, lo que aumenta el riesgo de contaminación o pérdidas.
- Requiere volúmenes elevados de muestras y reactivos, los cuales finalmente se transformarán en residuos (generalmente tóxicos e inflamables), no cumpliendo algunos los principios medioambientales de la Química Verde (principios 1, 2 y 8) [de la Guardia y Armenta, 2011].
- Implica tiempos de operación elevados, en ocasiones excesivamente largos.
- Presenta dificultad de automatización, aunque sí se han logrado algunos progresos, sobre todo en aplicaciones de tipo industrial.
- La posible formación de emulsiones que en algunos casos son difíciles de romper [Ali y Aboul-Enein, 2006].

Por todo ello, las membranas líquidas y sus características ventajosas pueden reemplazar en numerosas ocasiones el empleo de los procesos de extracción/reextracción en dos etapas, ya que permiten minimizar los inconvenientes mencionados. La principal característica de esta metodología, basada en el empleo de membranas, radica en poder realizar estos dos procesos en un único paso y de forma simultánea [Singh y Jang, 2009a]. Por tanto, esta técnica de preconcentración ha sido ampliamente desarrollada en los últimos años y en la actualidad cuenta con un amplio campo de aplicación en cuanto a separación, preconcentración y, en el caso de esta Tesis Doctoral, en la determinación de trazas de metales pesados en muestras ambientales acuosas.

II.A.2. Sistemas de membranas líquidas

II.A.2.1. Introducción a las membranas líquidas

En general, una membrana puede definirse como una barrera semipermeable entre dos fases, que permite el transporte de un determinado compuesto a través de ella de forma selectiva. En el caso de las membranas líquidas, esta barrera está constituida por una fase líquida que separa dos disoluciones inmiscibles con ella, a través de la cual se produce el transporte de alguna especie química. Este transporte tiene lugar mediante la simultaneidad de los procesos de extracción y reextracción, siendo esto un proceso cinético, en el cual no es necesario que se alcance el equilibrio [Noble y Way, 1987;

Bartsch y Way, 1996; López-López y col., 2010]. Una de las principales características de las membranas líquidas es que al estar constituidas por fases en estado líquido, los fenómenos de transferencia de masas suelen ser más rápidos, facilitándose los procesos de permeación, disolución y difusión.

La disolución donde se encuentra inicialmente la especie que se quiere transportar se denomina *disolución cargada* o *fase de alimentación*. La disolución de destino, se denomina *disolución receptora*. El caso más común es aquel en el que la membrana líquida está formada por una disolución orgánica, mientras que las disoluciones cargada y receptora son fases acuosas.

La primera aplicación de una membrana líquida al estudio y recuperación de metales fue descrita por Cussler en el año 1974 [Cussler y col., 1974], con un gran desarrollo posterior y aplicación en el análisis de trazas de metales pesados en ecosistemas acuáticos naturales [Parthasarathy y Buffle, 1994; Parthasarathy y col., 1997] y medios biológicos, así como en estudios de especiación metálica [Parthasarathy y col., 1999; Guyon y col., 1999]. Una de las ventajas principales que presenta la aplicación de esta técnica en el análisis de metales en aguas naturales radica en la posibilidad de eliminar interferencias de matriz, como son las sustancias húmicas en aguas dulces y las altas concentraciones de sal en aguas de naturaleza salina, entre otras. Además, ha sido una técnica muy aplicada en el campo industrial y tecnológico [Gill y col., 2000; Kislik, 2010].

En la aplicación de las membranas líquidas, conviene subrayar aspectos como son una menor manipulación de las muestras, así como el ahorro de tiempo del analista y de volúmenes de reactivos. De esta forma, se reduce el riesgo de contaminación o pérdidas de muestra, la realización de experimentos largos y tediosos, y el gasto innecesario de grandes cantidades de reactivos, lo cual conlleva a una menor generación de residuos tóxicos.

II.A.2.2. Tipos de membranas líquidas

Las configuraciones más ampliamente utilizadas hasta el momento son las siguientes: membranas líquidas de volumen (MLV o BLM, Bulk Liquid Membrane), membranas líquidas soportadas (MLS o SLM, Supported Liquid Membrane) y membranas líquidas de emulsión (MLE o ELM, Emulsion Liquid Membrane) [Bartsch y Way, 1996; Kislik, 2010]. A continuación se describen cada una de estas configuraciones, todas ellas destinadas a transportar, separar y preconcentrar el analito objeto de estudio. Además, en la Figura II.A.1 se ilustra un diseño esquemático para cada tipo de membrana aplicada a la separación de metales.

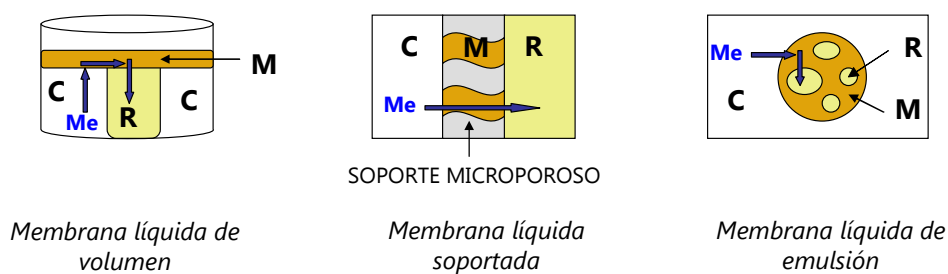


Figura II.A.1. Tipos de membranas líquidas más comúnmente usadas (C: Fase cargada; R: Fase receptora; M: Membrana líquida; Me: Metal)

➤ Membranas líquidas de volumen (MLV)

En esta configuración la membrana líquida está constituida por un volumen de fase orgánica al que usualmente se adiciona un determinado agente extractante. Esta fase separa a otras dos fases acuosas: la fase cargada (que contiene el analito que se quiere determinar) y la fase receptora (donde finalmente será extraído). Dentro de esta configuración existen distintos diseños, siendo el más frecuente el esbozado en la Figura II.A.1.

Debido a su sencillez y fácil manejo, ha sido muy utilizada a escala de laboratorio, donde se emplea para estudios sobre modelización de mecanismos de transporte, aplicación de transportadores novedosos y optimización de los sistemas químicos en términos de eficiencia y selectividad, entre otros [Rounaghi y col., 2012].

El disolvente orgánico ejerce un papel fundamental en este tipo de sistemas, ya que es el que constituye la membrana líquida, además de ser el medio en que se disuelve el agente extractante. Debe ser altamente inmisible con las fases acuosas y permitir la separación de las fases cargada y receptora. Los disolventes orgánicos más empleados en las membranas líquidas suelen ser los hidrocarburos de cadena larga (undecano, dodecano, queroseno) y compuestos más polares, como el éter dihexílico o el dioctil fosfato. Hay que destacar que el disolvente orgánico influye de manera directa en la estabilidad de la membrana y en la permeación del soluto.

El transporte del analito/s desde la fase cargada hasta la fase receptora, a través de la membrana líquida, depende de diversos factores físicos y químicos. Entre los primeros se encuentran la velocidad de agitación de las dos fases y el área de contacto entre la membrana líquida y las fases acuosas (la cual puede considerarse relativamente baja). Respecto a los parámetros químicos destacan el pH, la naturaleza,

concentración y fuerza iónica de la disolución reguladora en la fase cargada, así como el tipo y concentración de soluto. Por otro lado, en la fase receptora tiene especial interés el tipo de co-ión o contra-ión presente en ella y su concentración [Singh y Jang, 2009a].

En los últimos años, estas membranas han adquirido bastante importancia en cuanto a su aplicación a la determinación de trazas metálicas en aguas naturales. Han podido determinarse mediante esta metodología trazas de uranio [Ramkumar y col., 2002], de cobre [Mendiguchía y col., 2002; Granado-Castro y col., 2004a], cadmio [Granado-Castro y col., 2004b] o níquel [Aouarram y col., 2007; Domínguez-Lledó y col., 2007], entre otras. Entre las aplicaciones más recientes, se encuentran las extracciones de uranio [Shamsipur y col., 2010], mercurio [Minhas y col., 2010], plata [Rounaghi y col., 2011], paladio [Akin y col., 2012], extracción simultánea de cinc, cobre y níquel [Singh y col., 2011] y de cadmio y cinc en muestras de agua residual industrial [Dalali y col., 2012]. En los estudios llevados a cabo en este capítulo se optó por aplicar este tipo de membrana líquida desde un punto de vista analítico.

Hay que indicar que para procesos industriales es preferible la aplicación de membranas líquidas soportadas [Araki y Tsukube, 1990], ya que las grandes dimensiones de los procesos a escala industrial implicarían una gran cantidad de disolventes, necesarios para el montaje de una membrana líquida de volumen [Swain y col., 2010].

➤ Membranas líquidas soportadas (MLS)

Este tipo de membranas (Figura II.A.1) pueden presentarse en forma "*plana*" o de "*fibra hueca*".

- La configuración de membrana líquida soportada "*plana*" o "*laminar*" (FS-SLM, Flat-Sheet Supported Liquid Membrane) es la disposición clásica de las MLS para el estudio en el laboratorio, donde ofrecen resultados muy satisfactorios [Altin y col., 2010; Kandwal y col., 2011; Bhattacharyya y col., 2011; Pei y col., 2012a,b; Surucu y col., 2012]. Estas membranas están constituidas por una lámina de material polimérico microporoso, el cual es impregnado con la disolución orgánica (conteniendo el extractante) que es la que actúa como membrana líquida, permitiendo el transporte de la especie de interés una vez colocada entre las dos fases acuosas. Su principal inconveniente es la baja relación *área membrana/volumen de la fase tratada*, hecho que hace que el transporte sea relativamente lento [de Gyves y Rodríguez, 1999; San Román y col., 2010].

- Las membranas líquidas soportadas tipo "*fibras huecas*" (HF-SLM, Hollow-Fiber Supported Liquid Membrane) están constituidas por tubos capilares cilíndricos cuyas paredes están formadas por material polimérico microporoso que, al igual que en las de configuración plana, se impregna con la disolución orgánica (conteniendo el extractante) que actuará como membrana líquida. Este diseño sí tiene aplicación a nivel industrial por su fácil automatización. Las fibras huecas pueden agruparse para formar módulos de fibras huecas que, aunque aumentan el coste del equipo, permiten una introducción y recuperación de las fases líquidas de forma sencilla [Lee y col., 2008]. Destaca nuevamente su aplicación para la extracción de iones metálicos [Cukrowska y col., 2004; Zhang y col., 2010a; Es'haghi y Azmoodeh, 2010; Kandwal y col., 2012].

Uno de los principales inconvenientes que presentan las membranas líquidas soportadas es que el contacto de las fases acuosas con la fase orgánica puede causar pérdidas de esta última desde el interior de los poros, pudiendo llegar a perderse por completo y entrando así en contacto las dos disoluciones acuosas. Debido a ello, resulta conveniente que tanto disolvente como transportador presenten alta hidrofobicidad. Aún así, el sistema puede presentar bajas tasas en el transporte global, por la inestabilidad debida a la pérdida de la fase orgánica en los poros. No obstante, para minimizar estas pérdidas se han propuesto diversos dispositivos, como la utilización de sistemas de dos haces de capilares de fibra hueca, en los que el disolvente, además de hallarse en los poros de la membrana, se encuentra en un volumen mayor en el que se sumergen estos sistemas de capilares, garantizando así la presencia de fase orgánica en el interior de los poros.

Otra nueva configuración de membrana líquida soportada es la empleada por Belkhouche y colaboradores, donde la unidad de membrana consiste en dos bloques circulares de politetrafluoroetileno (PTFE) de 120 mm de diámetro y 8 mm de espesor. Cada bloque está formado por surcos dispuestos en forma de espiral con el fin de depositar un volumen total de 0,95 mL en cada cara de fases cargada y receptora. La membrana líquida se deposita entre ambos bloques de PTFE, los cuales están perfectamente sellados mediante seis tornillos. Toda esta unidad se conecta con dos bombas peristálticas empleadas para bombear las disoluciones cargada y receptora [Belkhouche y col., 2006].

➤ Membranas líquidas de emulsión (MLE)

El fundamento principal de este tipo de membranas se basa en la formación de una emulsión entre la membrana líquida y la fase acuosa receptora, ambas inmiscibles. La emulsión puede estabilizarse mediante la adición de un agente tensoactivo. Esta

emulsión se dispersa posteriormente en el seno de la fase acuosa cargada donde se encuentra la especie de interés, de forma que el volumen de esta última fase sea mucho mayor que el de la disolución receptora (Figura II.A.1). La transferencia de masas tiene lugar desde la fase acuosa cargada hasta la fase acuosa receptora a través de la fase orgánica.

Una de las características principales de este tipo de configuración de membranas líquidas reside en la gran superficie de contacto que proporciona este sistema emulsionado, lo que unido a su escaso grosor, permite altas velocidades de transporte [Kentish y Stevens, 2001; San Román y col., 2010; Chanukya y col., 2013]. Por otra parte, la elevada relación entre el volumen de las fases acuosas (cargada/receptora) permite obtener un elevado factor de concentración. Los mayores inconvenientes de éstas son la posible inestabilidad de la emulsión [Ahmad y col., 2011], la irreproducibilidad asociada a su preparación [Nunes y Peinemann, 2001] y la dificultad a la hora de recuperar el producto contenido en la fase receptora, lo cual implica la ruptura de la emulsión. Por todos estos motivos puede considerarse que su implementación industrial ha sido escasa.

Además de estas configuraciones, en los últimos años han ido encontrándose en la bibliografía otros sistemas alternativos y novedosos, sobre todo en lo referente a soportes sólidos. El campo de aplicación fundamental de estos sistemas ha sido la separación de especies metálicas en disoluciones acuosas, desde un punto de vista industrial o tecnológico. Entre ellos destacan las membranas poliméricas de inclusión (MPI), las membranas compuestas activadas (MCA) y las membranas líquidas híbridas (MLH).

En los últimos siete años, las membranas poliméricas de inclusión (MPI o PIM, Polymer Inclusion Membrane) han experimentado un destacado auge. Estas membranas se encuentran compuestas por un agente extractante adicionado sobre una base polimérica (comúnmente cloruro de polivinilo (PVC) o triacetato de celulosa (CTA)), donde además se adiciona un plastificante o modificador. Estas membranas han mostrado una excelente estabilidad y versatilidad, frente a otro tipo de membranas líquidas [Inês y col., 2012], siendo muy aplicadas en la separación y concentración de trazas metálicas, como plomo [Salazar-Álvarez y col., 2005; Benosmane y col., 2009; Oberta y col., 2011], uranio y molibdeno [Bayou y col., 2010], o cadmio y plomo [Arous y col., 2010], así como sistema complementario para la eliminación de iones metálicos tóxicos tales como Zn(II), Cd(II) y Pb(II) en lixiviados de vertidos industriales [Zawierucha y col., 2013] o bien para la extracción de cesio procedente de residuos nucleares [Mohapatra y col., 2009].

Asimismo, el uso de las membranas compuestas activadas (MCA o ACM, Activated Compositated Membrane) supuso una alternativa frente a las membranas líquidas soportadas. El diseño de estas membranas se fundamenta en la idea de introducir un agente extractante en el interior de una membrana sólida formada por un soporte microporoso (polisulfona) y una capa polimérica densa sintetizada por polimerización interfacial. La gran selectividad de estas membranas se debe a la acción del agente transportador y a la estabilidad y permeabilidad de las mismas, encontrándose la fase orgánica atrapada en el interior de su estructura apilada. Estas membranas han sido aplicadas en los últimos 15 años como una nueva generación de membranas para la separación de trazas metálicas. Se citan como ejemplos algunas de sus aplicaciones en la separación de Zn(II) procedente de efluentes hidrometalúrgicos [Oleinikova y col., 1999], Pb(II) [Kozłowski, 2006], Pb(II) y Cd (II) [Gumí y col., 2000], Hg(II) [Páez-Hernández y col., 2004], Pt(IV) [Resina y col., 2008], Cr(III) [Arslan y col., 2009a] o Cr(VI) [Arslan y col., 2009b; Melita y Popescu, 2008].

Por último, en las membranas líquidas híbridas (MLH o HLM, Hybrid Liquid Membrane), aparecidas en la segunda parte de la década de los noventa, la disolución que contiene el agente extractante circula o fluye entre las membranas, en lugar de impregnar las membranas porosas con esta disolución, como es el caso de las membranas líquidas soportadas (MLS). Las membranas son permeables a los solutos, pero no permiten el paso del extractante hacia las fases de alimentación y receptora. Esta obstrucción se consigue gracias al empleo de membranas hidrofílicas/hidrofóbicas, membranas con propiedades para intercambiar iones, o mediante el tamaño de poro de las mismas. En comparación con otro tipo de membranas (MLV, MLS o MLE), las membranas líquidas híbridas ofrecen numerosas ventajas económicas y operacionales, como bajas pérdidas de extractante, larga vida útil de las membranas o aplicación de distintas fuerzas impulsoras (gradientes de potencial químico, presión o temperatura entre los distintos compartimentos, etc.). Este tipo de membranas se han empleado satisfactoriamente en el transporte de Ti(IV) [Kislik y Eyal, 1996], la recuperación de Cu(II) y Cd(II) [Eyal y Kislik, 1999], en la extracción de Co(II) y Ni(II) [Gega y col., 2001], la separación de Cu(II), Cd(II) y Zn(II) de disoluciones procedentes de la producción de ácido fosfórico [Kislik y Eyal, 2000a,b] o en la transferencia y separación entre Cd(II) y Fe(III) presentes en una misma disolución acuosa [Liu y col., 2007a].

II.A.2.3. Tipos de mecanismos de transporte en membranas líquidas

El transporte a través de la membrana puede llevarse a cabo mediante distintos mecanismos, pudiéndose diferenciar a grandes rasgos aquellos mecanismos basados en la solubilidad del soluto en la membrana (permeación) y los que utilizan un agente

extractante para realizar el transporte (transporte asistido). A continuación se describen los distintos tipos de transporte [Schlosser, 1993; Kislik, 2010; San Román y col., 2010], los cuales han sido esquematizados en la Figura II.A.2:

- **Transporte simple.** La membrana líquida está constituida simplemente por un disolvente orgánico. Este transporte se puede realizar de dos maneras: por *permeación simple* o por *permeación con reacción química en la disolución receptora*.
 - *Permeación simple.* Las especies químicas atraviesan la membrana líquida, desde la fase de alimentación hasta la receptora, debido a su solubilidad en ella. El transporte se detiene cuando se alcanza el equilibrio entre las distintas fases.
 - *Permeación con reacción química en la disolución receptora.* El transporte se ve incrementado por la presencia de un reactivo apropiado en la disolución receptora que reacciona con la especie transportada. De esta forma se aumenta la capacidad y la selectividad del transporte, especialmente si el producto formado en la disolución receptora es insoluble en la membrana líquida.
- **Transporte asistido.** En este caso, la disolución orgánica que actúa como membrana líquida lleva disuelto un agente extractante que realiza el papel de transportador de las sustancias que se desean transferir desde la fase acuosa cargada a la receptora. La adición de este reactivo supone una mejora de la permeabilidad y selectividad de la membrana [San Román y col., 2010]. Existen distintos tipos de transporte asistido, entre los que se encuentran:
 - *Transporte facilitado.* Las especies a transportar, aunque pueden pasar a través de la membrana por permeación simple, también reaccionan reversiblemente con el agente transportador, el cual acelera este transporte.
 - *Contratransporte acoplado.* El analito forma un complejo con el extractante, el cual difunde hasta la interfase de la disolución receptora, donde es liberado por la acción de una sustancia química, que, al unirse al extractante, produce el proceso opuesto, siendo transportada esta nueva sustancia hacia la disolución cargada en sentido contrario.
 - *Cotransporte acoplado.* La especie de interés es transportada conjuntamente con otra especie presente en la disolución cargada, y que resulta necesaria

para mantener la neutralidad de los complejos formados en la disolución orgánica.

- *Transporte primario activo*. Existe también un cotransporte de especies impulsado por la existencia de reacciones redox.

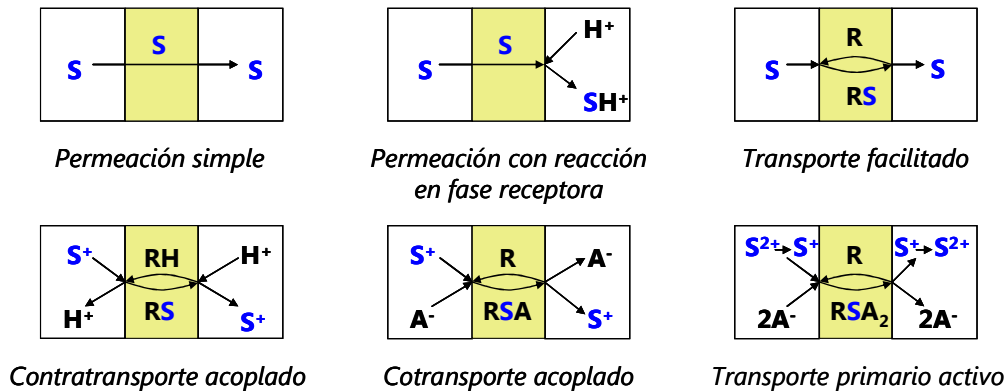


Figura II.A.2. Principales mecanismos de transporte en membranas líquidas (S: Solute; R: Reactivo transportador; A: Especie cotransportada) [Kislik, 2010]

II.A.2.4. Agentes extractantes: transporte asistido

Tanto en la extracción líquido-líquido como en los sistemas de membranas líquidas, en los que se basa este capítulo, es fundamental una adecuada elección del agente extractante que transportará el metal a través de la membrana líquida [Rydberg y col., 2004]. En base a las características y propiedades de cada reactivo, se pueden encontrar numerosos extractantes.

En general, el empleo de agentes extractantes en las membranas líquidas presentan las siguientes ventajas a destacar [Noble y Way, 1987]:

- La posibilidad de alcanzar mayores flujos de materia.
- Permite realizar separaciones de gran selectividad. La elección del transportador adecuado hace posible que la separación sea selectiva y no se base sólo en un simple proceso de solubilidad y difusión del analito de interés.
- Los iones pueden concentrarse, ya que el transporte acoplado permite el paso de éstos en contra del gradiente de concentración.

- Permite el empleo de pequeñas cantidades o volúmenes de extractante, lo que hace posible la utilización de extractantes de alto coste o difícil obtención.

Para poder presentar estas ventajas, los agentes transportadores deben poseer a su vez las siguientes características [Kislik, 2010]:

- Alta selectividad por las especies a transportar/separar.
- Alta capacidad del reactivo para extraer al analito desde la fase acuosa de alimentación hasta la membrana líquida al ponerse ambos en contacto en la interfase fase cargada/membrana líquida (alto coeficiente de extracción, partición o distribución en la fase orgánica).
- Alta capacidad del complejo analito-reactivo, formado en la membrana líquida, para ser separado y liberado en la fase receptora al entrar en contacto con la interfase membrana/fase receptora (alta constante de disociación).
- Rápida cinética de formación y destrucción del complejo en las distintas interfases.
- Rápida cinética de difusión del complejo analito-reactivo en el seno de la membrana.
- Alta estabilidad del reactivo.
- Ausencia de reacciones secundarias.
- Ausencia de reacciones irreversibles o de degradación.
- Baja solubilidad del reactivo en las fases acuosas.
- El reactivo debe poder regenerarse fácilmente.
- Debe tener propiedades físicas adecuadas (tales como densidad, viscosidad, tensión superficial, etc.).
- Baja toxicidad para los sistemas biológicos y baja corrosividad.
- Precio razonable, sobre todo en el caso de aplicaciones industriales.

En la Tabla II.A.3 se muestran los agentes extractantes más representativos, los cuales pueden ser específicos para un metal determinado bajo determinadas condiciones, o por el contrario genéricos si se opta por un transporte simultáneo. En esta Tesis Doctoral se ha desarrollado una membrana líquida empleando un compuesto perteneciente al grupo de las *tiosemicarbazonas*.

Tabla II.A.3. Principales agentes extractantes ácidos, básicos, solvatantes y quelatantes empleados en la extracción líquido-líquido de metales y su aplicación comercial [Aguilar y Cortina, 2008]

Tipo	Extractante	Aplicación comercial
Extractantes ácidos		
Ácidos carboxílicos	Ácidos nafténicos Ácidos versáticos	Separación de Cu/Ni Extracción de Ni Extracción de Y
Ácidos alquilo fosfóricos	Ácidos monoalquilo fosfóricos	Extracción de Fe Extracción de Sb y Bi
	Ácidos dialquilo fosfóricos y sus análogos sulfúricos	Extracción de U Extracción de tierras raras Separación de Co/Ni Extracción de Zn
Ácidos alquilo fosfónicos	Ácido 2-etilhexilfosfónico 2-etilhexil éster y su análogo sulfónico	Separación de Co/Ni Separación de tierras raras
Ácidos alquilo fosfínicos	Ácidos dialquilo fosfínicos y sus análogos sulfínicos	Separación de Co/Ni Extracción de Zn y Fe
Ácidos aril sulfónicos	Ácido dinonilnaftaleno sulfónico	Extracción de Mg
Extractantes ácidos quelatantes		
Derivados de hidroxioxima	α -alquilaril hidroxioximas (LIX 63) β -alquilaril hidroxioximas (LIX 860, M5640)	Extracción de Cu Extracción de Ni
Derivados de 8-hidroxiquinoleína	Chelex 100, 120 LIX 26	Extracción de Ga Propuesto para la extracción de Cu
Derivados de β -dicetona	LIX 54 Hostarex DK16	Extracción de Cu
Derivados de bis-ditiofosforamida	DS 5968, DS 6001	Extracción de Zn Separación de Co/Ni/Mn
Ácidos hidroxámicos	LIX 1104	Extracción de Fe Extracción de Sb y Bi
Extractantes básicos		
Aminas secundarias	LA-1, LA-2 Adogen 283	Extracción de U Propuesto para la extracción de V y W
Aminas terciarias	Alamine 336 Adogen (diversos tipos)	Extracción de U, Co, W, V y otros

Tabla II.A.3 (cont.). Principales agentes extractantes ácidos, básicos, solvatantes y quelatantes empleados en la extracción líquido-líquido de metales y su aplicación comercial [Aguilar y Cortina, 2008]

Tipo	Extractante	Aplicación comercial
Extractantes básicos		
Aminas cuaternarias	Aliquat 336 Adogen 464	Extracción de V Posible extracción de Cr, W, U y otros
Amina cuaternaria + nonil fenol	LIX 7820	Extracción de cianuro metálico aniónico
Trialkilguanidina	LIX 79	Extracción de Au
Extractantes solvatantes y quelatantes no iónicos		
Reactivos donantes C-O	Alcoholes (decanol) Cetonas (MIBK) Ésteres Éteres, etc	Separación de Nb/Ta Separación de Zr/Hf
Reactivos donantes P-O y S-P	Ésteres fosfóricos Ésteres fosfónicos Ésteres fosfinicos Óxidos de fosfina y sus análogos de S	Extracción de Fe Separación de Zr/Hf Separación de Nb/Ta Separación de tierras raras Extracción de Au
Reactivos donantes S-O	Sulfuros Sulfóxidos	Extracción de Pd
Reactivos donantes N	Bi-imidazoles y bi-bencilimidazoles Éster piridindicarboxílico	Extracción de Zn Separación de Zn/Fe Extracción de Cu

II.A.2.4.1. Compuestos del tipo *imino* como agentes transportadores

Uno de los grupos de compuestos orgánicos más frecuentemente empleados en la extracción de iones metálicos lo forman aquellos caracterizados por la presencia del grupo *imino* o *azometino* ($C=N$) en su estructura. Los compuestos del tipo *imino* se sintetizan de manera simple mediante una reacción de condensación entre compuestos carbonílicos y aminas primarias, según puede observarse en la Figura II.A.3. Así, según la naturaleza de R, se pueden obtener -entre otros- oximas, acinas, hidrazonas, semicarbazonas, tiosemicarbazonas y selenosemicarbazonas. Todos estos compuestos orgánicos se muestran en la Tabla II.A.4.

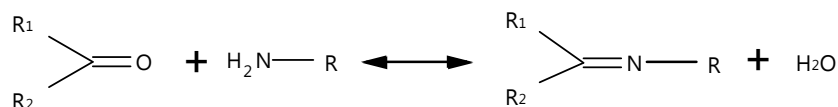


Figura II.A.3. Obtención de compuestos de tipo *imino* por reacción de compuestos carbonílicos con aminas primarias

Tabla II.A.4. Sustituciones más características en el grupo *imino*

$ \begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \diagdown \\ \text{C}=\text{N}-\text{R} \\ \diagup \\ \text{R}_2 \end{array} $	Sustitución R	Grupo de compuestos
	-OH	<i>Oximas</i>
	-N=CR ₃ R ₄	<i>Acinas</i>
	-N-R ₃ R ₄	<i>Hidrazonas</i>
	-NR ₃ -CO-NR ₄ R ₅	<i>Semicarbazonas</i>
	-NR ₃ -CS-NR ₄ R ₅	<i>Tiosemicarbazonas</i>
	-NR ₃ -CSe-NR ₄ R ₅	<i>Selenosemicarbazonas</i>

Generalmente, una de las características principales de estos compuestos es su capacidad para actuar como ligandos multidentados y formar complejos coloreados con diversos cationes metálicos, generalmente los metales de transición.

En estos compuestos, excepto en el caso de las oximas, el átomo de nitrógeno perteneciente al grupo azometino (C=N) se denomina *nitrógeno imínico*, mientras que el inmediatamente posterior se conoce como *nitrógeno amínico* [Kitaev y col., 1970].

Las *hidrazonas* son compuestos orgánicos caracterizados por la presencia de la agrupación triatómica C=N-N. En la Figura II.A.4 se representa su estructura química genérica, donde R₁, R₂, R₃ y R₄ representan la existencia de hasta cuatro radicales. Dentro de las hidrazonas, los radicales pueden ser de distinta naturaleza, lo que da lugar a distintos tipos de hidrazonas. Los sustituyentes pueden ser: protones, radicales alquilo, radicales arilo, radicales acilo, radicales O-alquilo, radicales O-arilo, así como grupos nitrilo o halógenos. En aquellos casos en los que la sustitución R₃ y/o R₄ es por grupos aromáticos, reciben el nombre de aroilhidrazonas.

Las hidrazonas son compuestos que presentan la propiedad de formar complejos coloreados de alta absortividad molar con diversos cationes metálicos. Esta propiedad se debe fundamentalmente a la presencia de diversos sitios de coordinación en la molécula, por lo que estos compuestos han sido ampliamente aplicados en campos

como el de la medicina [Shyam y col., 1985; Mohan y col., 1988; Suvarapu y col., 2012] y la química analítica y orgánica, por su gran bioactividad. Así, algunos tipos de hidrazonas y sus derivados han demostrado poseer propiedades antibióticas, antituberculosas, antifúngicas, antitumorales, anticonvulsionantes, antiinflamatorias y anticancerígenas [Alntop y col., 2012; Sathyadevi y col., 2012; Nfor y col., 2013], así como funciones insecticidas, nematocidas, rodenticidas y reguladores del crecimiento de las plantas.

Las *semicarbazonas*, *tiosemicarbazonas* y *selenocarbazonas* pueden considerarse como hidrazonas específicas, donde uno de los radicales (R_4 en la Figura II.A.4) se sustituye por un grupo $\text{CO-NR}_4\text{R}_5$, $\text{CS-NR}_4\text{R}_5$ ó $\text{CSe-NR}_4\text{R}_5$, respectivamente.

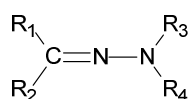


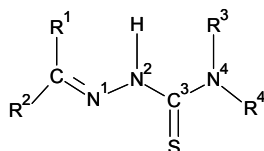
Figura II.A.4. Estructura genérica para las hidrazonas con la agrupación triatómica C=N-N

II.A.2.4.1.1. Principales características de las tiosemicarbazonas y su empleo como agentes quelatantes

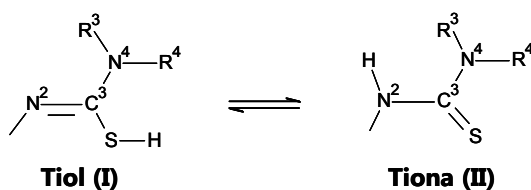
La estructura general de las *tiosemicarbazonas* (Figura II.A.5) está principalmente integrada por la cadena N(1)-N(2)-C(3)-N(4) (según el sistema de numeración de la IUPAC), la cual presenta un cierto grado de deslocalización electrónica que impide la existencia de una rotación libre en torno a esos enlaces. También son posibles diversas conformaciones respecto a dichos enlaces y, en particular, distintas configuraciones alrededor de la unión C-N(1), lo que hace que estas moléculas sean ligandos potencialmente versátiles, dada la existencia de átomos de nitrógeno y azufre con pares de electrones libres susceptibles de ser donados.

La estructura que posee la molécula de tiosemicarbazida proporciona una alta capacidad como agente quelatante, viéndose ésta incrementada al emplear aldehídos y cetonas adecuados para la formación de bases de Schiff (tiosemicarbazonas), de forma que posean un átomo donador más y se conviertan finalmente en ligandos tridentados [Belicchi-Ferrari y col., 2007]. La formación de la tiosemicarbazona es una simple reacción de adición, donde el N nucleofílico del grupo NH_2 de la tiosemicarbazida se une al carbono del grupo carbonilo de la otra molécula (aldehído o cetona),

formándose el grupo *imino* y eliminándose así una molécula de agua [Srinivasan y col., 2013].



Estructura general de las tiosemicarbazonas



Tautomería tiol-tiona

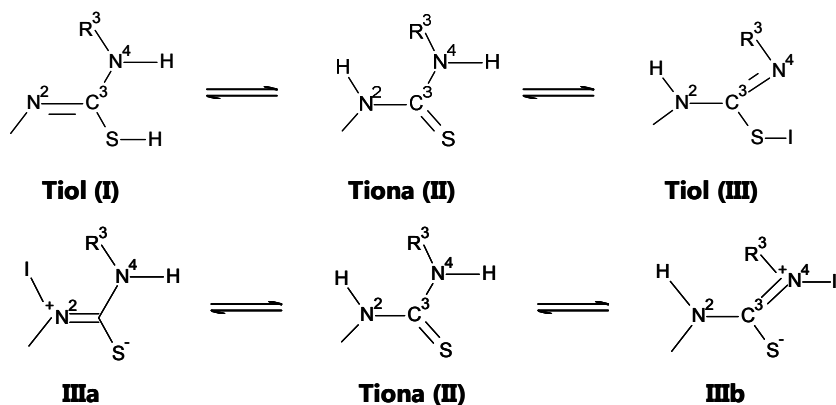


Figura II.A.5. Estructura y formas de resonancia de las tiosemicarbazonas [Rodríguez-Riobó, 2007]

Una de las características más destacadas en estas moléculas es la existencia de una tautomería tiol-tiona, la cual puede apreciarse en la Figura II.A.5. En esta figura también puede observarse, además de las formas tautómeras tiol (I) y tiona (II), otra posible forma tiol (III) e igualmente formas iónicas IIIa y IIIb, en el caso de que los grupos denominados R₃ o R₄ sean átomos de hidrógeno; es decir, se observa una deslocalización de carga por toda la molécula.

Por lo general, las tiosemicarbazonas pueden considerarse sistemas planos, debido a la deslocalización de carga a través de la molécula, como puede apreciarse en la Figura II.A.6.

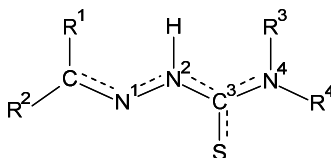


Figura II.A.6. Deslocalización de carga en la molécula de tiosemicarbazona

Estos efectos de resonancia se reflejan en las distancias de enlace interatómicas de la molécula, donde el enlace C=S presenta una distancia de enlace intermedia entre las correspondientes a un enlace C-S simple (1,82 Å) y doble (1,56 Å). Por otro lado, los enlaces N(1)-N(2), N(2)-C(3) y C(3)-N(4) son más cortos que los enlaces sencillos convencionales. Todos estos datos experimentales indican la existencia de una cierta deslocalización electrónica en la molécula [Bautista y col., 2013]

Desde el punto de vista coordinativo, las tiosemicarbazonas pueden actuar como ligandos neutros (en forma de tiona) o monoaniónica (por pérdida del protón del tiol). De esta forma, pueden dar lugar a la formación de compuestos neutros, aniónicos o catiónicos. Cuando las tiosemicarbazonas se encuentran en estado neutro, actúan fundamentalmente en forma de tiona, aunque se han podido aislar complejos donde están presentes ambas formas tautoméricas (tiol y tiona).

Por lo que respecta a los complejos con tiosemicarbazonas, lo más habitual es que éstas coordinen al ion metálico con una configuración *cis*, actuando como ligando bidentado a través del átomo de azufre tiona-tiol y el átomo de nitrógeno hidrazínico, con conformación de un anillo quelato de cinco miembros que confiere una gran estabilidad a este tipo de coordinación, especialmente con metales en bajo estado de oxidación, como los d^8 de bajo espín de Pd(II) y Pt(II) y los d^{10} de Cu(I), Ag(I) y Au(I) o Hg(II).

Cuando en la proximidad de los centros dadores S y N existen más átomos potencialmente donadores de pares electrónicos libres capaces de coordinar a iones metálicos, las tiosemicarbazonas pueden comportarse como ligandos tridentados, tetradentados o pentadentados, y también se puede producir la formación de dímeros y polímeros (Figura II.B.7) [Rodríguez-Riobó, 2007].

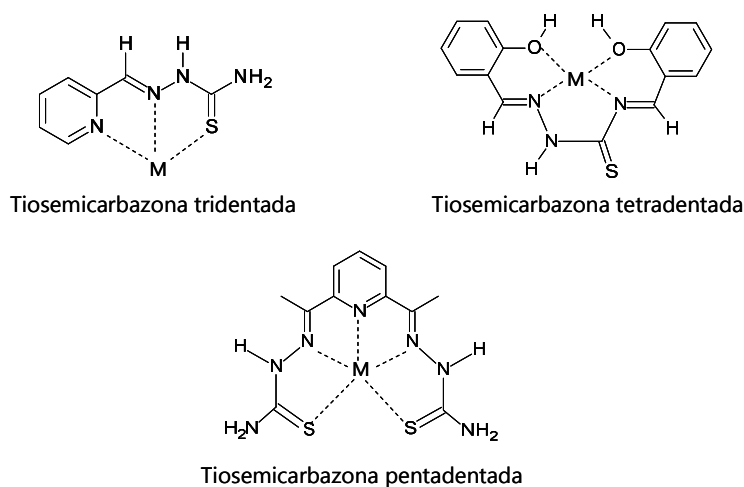


Figura II.B.7. Posibilidades de coordinación de las tiosemicarbazonas [Rodríguez Riobó, 2007]

Como se ha indicado anteriormente, las tiosemicarbazonas son compuestos con una gran versatilidad estructural y pueden coordinar con los metales en forma de ligando neutro o como anión desprotonado, a través de los átomos donadores *N*, *N*, *S* o *O*, *N*, *S* [Ferrari y col., 1992].

Al igual que las hidrazonas, las bases de Schiff macrocíclicas denominadas *tiosemicarbazonas* y sus complejos metálicos, son muy conocidas por sus propiedades biológicas y anticarcinógenas, antibacterianas y como fungicidas [Bindu y col., 1998; Alomar y col., 2013; Walcourt y col., 2013; Mohamed y col., 2014]. Es de destacar sus propiedades medicinales, sobre todo por su grado de actividad como agentes quimioterapéuticos contra el cáncer [Franco y col., 2000; Stanojkovic y col., 2010; Anitha y col., 2013; Palanimuthu y Samuelson, 2013]. Todo ello es debido a las propiedades de estos compuestos para formar quelatos con los iones de transición y a las propiedades redox de estos complejos. Estos procesos redox pueden ser debidos tanto a la reducción/oxidación del metal central como del ligando [El-Shazly y col., 2005].

En el campo de la Química, las tiosemicarbazonas han sido ampliamente aplicadas como agentes quelatantes en la determinación espectrofotométrica de metales, como por ejemplo de Cd(II) y Pb(II) en muestras acuosas y de alimentos [Koduru y Lee, 2014], de Zn(II) en alimentos y muestras medioambientales [Reddy y col., 2007; Reddy y col., 2012], o de Cu(II) [Reddy y col., 2008]; en el desarrollo de sensores fluorescentes para la

detección de aniones [Santos-Figueroa y col., 2012] y de cationes como Hg(II), Cu(II), Zn(II) o Fe(III) en fase acuosa [Wang y col., 2010d; Tang y col., 2013; Li y col., 2008; Casanueva-Marengo y col., 2012]; en el desarrollo de métodos de extracciones en fase sólida de diversas muestras, como en la especiación de Cr(III)/Cr(VI) en muestras de agua reales [Mahmoud y col., 2008], Cu(II) en muestras de agua, suelo y alimentos [Chamjangali y col., 2011], o separación y determinación simultánea de Co(II), Ni(II), Cu(II) y Pd(II) en muestras de agua por microextracción en fase sólida [Kaur y col., 2007]; en determinaciones electroquímicas mediante voltametría de redisolución catódica adsorbtiva, como en la determinación de Cu(II) en muestras acuosas [Galeano-Díaz y col., 2006], y biológicas [Mahajan y col., 2006]; o como reactivos empleados en el desarrollo de electrodos selectivos de iones (basados en determinaciones potenciométricas), como de Hg(II) [Mahajan y col., 2003], Ba(II) [Zamani y col., 2010] o Bi(III) [Yan y col., 2013].

II.A.2.5. Variables que determinan el proceso de transporte en membranas

Es muy importante conocer el mecanismo de transporte por el que tiene lugar la transferencia de un determinado analito en una membrana líquida. En base a este transporte se optimizarán determinados parámetros, con el fin de obtener el mayor rendimiento posible en el proceso. Así, destaca que:

- La mayoría de las configuraciones de membranas líquidas precisan de un sistema de agitación o un flujo continuo de las dos disoluciones acuosas. En el caso de las membranas líquidas de volumen, se utiliza agitación magnética tanto en la fase cargada como en la fase receptora, para favorecer el transporte de la especie de interés a través de la membrana. En este sistema se produce una fina capa inmóvil en la interfase entre las disoluciones acuosas y la orgánica. Esta capa o interfase se denomina *capa de difusión*, debido a que el transporte de masas a través de la misma ocurre mediante un proceso de difusión. De esta forma, la velocidad de transporte de un analito a través de la membrana líquida va a estar limitada principalmente por este paso, así como por la velocidad de la reacción química entre éste y el agente extractante o transportador, cuando es empleado [Peterson y Lamb, 1996; Lazarova y Boyadzhiev, 1993; Ma y col., 2004; Marchese y Campderrós, 2004a; Marchese y col., 2004b; Bansal y col., 2005; Zhang y col., 2010a; Minhas y col., 2013].
- Debe tenerse en cuenta que en determinados casos de transporte facilitado, el transporte del analito objeto de estudio puede llevar asociado un contratransporte de otro elemento desde la fase receptora hacia la cargada, con el objetivo de regenerar el transportador. En muchos casos y en dirección inversa

se suelen transportar iones H^+ , lo que implica la existencia de una diferencia entre los valores de pH de la disolución cargada y la receptora. De ahí que en el proceso de optimización de estos sistemas, sea preciso establecer la acidez óptima de ambas disoluciones acuosas, así como utilizar una disolución reguladora adecuada que controle el pH de cada una, evitando los posibles cambios ocasionados si se produce contratransporte de H^+ [Gholivand y Khorsandipoor, 2000; Rouhollahi y col., 2007].

- Por último, y como ya se ha mencionado, el transporte a través de una membrana líquida también se verá influenciado por la elección de un disolvente orgánico adecuado, la naturaleza del analito de interés, la selección del agente transportador que vaya a emplearse, así como por las características de las disoluciones que intervienen.

II.A.2.6. Eficacia en el proceso de transporte en membranas líquidas

La eficacia de un proceso basado en la transferencia/s de especie/s química/s a través de una membrana líquida se suele evaluar mediante el flujo de materia J que tiene lugar a través de la membrana en un periodo de tiempo determinado. Matemáticamente, el flujo de materia puede definirse mediante la siguiente expresión [Danesi, 1985]:

$$J = -\frac{d[M]_f}{dt} \cdot \frac{V_f}{Q}; \quad [1]$$

donde $[M]_f$ representa la concentración de la especie química en la disolución o fase cargada; V_f es el volumen de la fase cargada; y Q es el área efectiva de la membrana.

Igualmente, el flujo de materia puede expresarse en función de parámetros relacionados con él, como el coeficiente de permeabilidad P , que se define como el cociente entre el flujo y la concentración de la especie de interés en la disolución cargada:

$$P = \frac{J}{[M]_f} \quad [2]$$

Sustituyendo el valor de J por el dado en [1], se obtiene una nueva expresión para la permeabilidad:

$$P = -\frac{1}{[M]_f} \cdot \frac{d[M]_f}{dt} \cdot \frac{V_f}{Q} \quad [3]$$

Si se integra esta última expresión [3], se obtiene la siguiente ecuación:

$$-\ln[M]_{f,t} = \frac{Q}{V_f} P \cdot t - \ln[M]_{f,0}; \quad [4]$$

en la que $[M]_{f,t}$ representa la concentración de la especie estudiada en la disolución cargada en el tiempo t y $[M]_{f,0}$ es la concentración inicial de la especie en dicha fase. A partir de la reorganización de la expresión [4], finalmente se obtiene:

$$\ln \frac{[M]_{f,0}}{[M]_{f,t}} = \frac{Q}{V_f} P \cdot t \quad [5]$$

Si se representa la variación del logaritmo neperiano de la concentración inicial de la especie en la fase cargada respecto de la concentración de la especie en un tiempo t , frente al tiempo, se obtiene una recta cuya pendiente es:

$$\text{Pendiente} = \frac{Q}{V_f} \cdot P \quad [6]$$

De esta expresión [6] puede obtenerse el valor de la **permeabilidad P** , parámetro que permite evaluar la eficacia de un determinado proceso de transporte a través de una membrana líquida, una vez que se conoce el área efectiva de la membrana y el volumen de la fase de alimentación en la celda. Se expresa en unidades de cm min^{-1} . No obstante, la forma más habitual de expresar la eficacia del transporte suele ser mediante el porcentaje de recuperación de la especie en la fase receptora.

II.A.2.7. Aplicación de las membranas líquidas en la separación y/o preconcentración de trazas metálicas en aguas naturales

Una de las principales aplicaciones de las membranas líquidas es la separación y/o preconcentración de trazas metálicas presentes en aguas naturales, lo que facilita su determinación. La principal justificación para aplicar esta metodología en estos medios radica en las bajas concentraciones que presentan los metales en los ecosistemas acuáticos naturales (preconcentración), además de la presencia de matrices complejas o sustancias interferentes (separación).

No obstante, y de forma general, las membranas líquidas han sido aplicadas fundamentalmente en los siguientes procesos [Spreti y col., 2004]:

- Análisis de metales traza en muestras de aguas naturales.
- Separación y concentración de metales en aguas residuales.

- Eliminación y recuperación de metales de residuos industriales y aguas residuales.
- Recuperación y separación selectiva de metales con aplicaciones metalúrgicas y medioambientales.

En la Tabla II.A.5, Tabla II.A.6 y Tabla II.A.7 se muestran algunas aplicaciones analíticas de membranas líquidas de volumen, soportada o de emulsión para la determinación de metales pesados en muestras acuosas medioambientales de distinta naturaleza. Algunos métodos han sido sólo desarrollados, mientras que otros han sido también aplicados a determinadas muestras reales.

Tabla II.A.5. Algunas aplicaciones analíticas de membranas líquidas de volumen en la determinación de metales pesados en aguas (diez últimos años)

Tipo de muestra	Agente extractante/disolvente	Metal	Referencia
n.a.	Alamine 304, Alamine 336/queroseno	Cd(II)	Kontrec y col., 2003
Agua de mar	2-APBH/tolueno	Cu(II)	Granado-Castro y col., 2004a
Agua de mar	2-APBH/tolueno	Cd(II)	Granado-Castro y col., 2004b
n.a.	TT12C4/cloroformo	Au(III)	Mashahadizadeh y col., 2004
n.a.	D2EHPA/queroseno	Co(II)	León y Guzmán, 2004; 2005
n.a.	N,N-dietil-N'-canfanil tiourea/cloroformo	Ag(I)	Berhe y col., 2006
n.a.	DBDA15C4/cloroformo	Zn(II)	Fakhari y col., 2006
Agua de mar	D2EHPA/queroseno	Cd(II)	Irigoyen y col., 2006
n.a.	p-terc-butil calix[4]areno 3-morfolinopropildiamida/cloroformo	Cr(VI)	Saf y col., 2006
Muestras de agua de grifo y pozo con torio	HTTA/tetracloruro de carbono	Th(IV)	Yaftian y col., 2006
Agua de mar	2-HBET/tolueno	Ni(II)	Aouarram y col., 2007
Agua de mar	2-APBH/tolueno	Ni(II)	Domínguez-Lledó y col., 2007

Tabla II.A.5 (cont.). Algunas aplicaciones analíticas de membranas líquidas de volumen en la determinación de metales pesados en aguas (diez últimos años)

Tipo de muestra	Agente extractante/disolvente	Metal	Referencia
n.a.	DNNSA/queroseno y o-xileno	Cr(III)	Gawroński y Religa, 2007
n.a.	NBSND/cloroformo	Cu(II)	Rouhollahi y col., 2007
Agua de mar	2-APBH/tolueno	Cu(II), Cd(II), Ni(II)	Granado-Castro y col., 2008
n.a.	D2EHPA, Cyanex 272 o LIX 984N/queroseno	Cu(II)	León y Guzmán, 2008
n.a.	MTTT, PHDC/queroseno	Cu(II), Ni(II), Zn(II), Mn(II)	Nezhadali y col., 2008
Agua natural	LA, 22DD/tolueno	Cu(II)	Wojciechows y col., 2008
n.a.	p-terc-butilcalix[4]areno dioxaoctilamida/diclorometano	Cr(VI)	Yilmaz y col., 2008
Lixiviado ácido de baterías de Ni-Cd recargables	HDTBr/diclorometano	Cd(II)	Jafari y col., 2009
Aguas residuales de galvanoplastia	TBP/hexano	Cr(VI)	Muthuraman y col., 2009
n.a.	TBP/queroseno	Cr(VI)	Zhang y col., 2009
n.a.	Derivados de calix[4]arenos/cloroformo	Hg(II)	Hilal Gubbuk y col., 2010
n.a.	Derivados de calix[4]arenos/cloroformo	Hg(II)	Minhas y col., 2010
n.a.	Compuestos macrocíclicos di-N-bencilados/cloroformo	Ag(I)	Nezhadali, 2010
Aguas residuales de galvanoplastia	8-HQ/cloroformo	Cu(II)	Reddy y col., 2010
n.a.	HTTA, DC18C6/cloroformo	U(VI)	Shamsipur y col., 2010
n.a.	p-terc-butilcalix[4]areno 3-dietilaminopropildiamida/diclorometano	Cr(VI)	Alpaydin y col., 2011

Tabla II.A.5 (cont.). Algunas aplicaciones analíticas de membranas líquidas de volumen en la determinación de metales pesados en aguas (diez últimos años)

Tipo de muestra	Agente extractante/disolvente	Metal	Referencia
n.a.	DTB/cloroformo	Co(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Ag(I), Cu(II), Mn(II)	Nezhadali y Rabani, 2011
n.a.	Kryptofix5/diclorometano	Ag(I)	Rounaghi y col., 2011
n.a.	D2EHPA/queroseno	Cu(II), Ni(II), Zn(II)	Singh y col., 2011
n.a.	Calix[4]areno/diclorometano	Pd(II)	Akin y col., 2012
Agua residual industrial	Aliquat 336/benceno	Cd(II), Zn(II)	Dalali y col., 2012
Agua de río, potable y subterránea	DC18C6/cloroformo	Pb(II)	Rounaghi y col., 2012
n.a.	D2EHPA/queroseno	Cd(II)	Koter y col., 2013
Agua de estuario	TIBPS/tolueno	Ag(I)	López-López y col., 2013

n.a.: no se ha aplicado el método en muestras reales.

22DD: 1,10-didecil-1,10-diaza-18-corona-6; **2-APBH**: 2-acetilpiridina benzoilhidrazona; **2-HBET**: 2-hidroxibenzaldehído N-etiltiosemicarbazona; **8-HQ**: 8-hidroxiquinoleína; **Alamine 304**: tridodecilamina; **Alamine 336**: tri-(C8-C10) amina; **Aliquat 336**: cloruro de metiltricaprilamonio; **Cyanex 272**: ácido bis-2,2,4-trimetilpentilfosfínico; **D2EHPA**: ácido di-(2-etilhexil) fosfórico; **DBDA15C4**: 5,6,14,15-dibenzo-1,4-dioxa-8,12-diazaciclopentadeca-5,14-dieno; **DC18C6**: dicitclohexil-18-corona-6; **DNNSA**: ácido di-nonil naftalensulfónico; **DTB**: 2,2'-ditio(bis)benzotiazol; **HDTBr**: bromuro de hexadeciltrimetilamonio; **HTTA**: 2-tenoiltrifluoroacetona; **Kryptofix5**: 1,13-bis(8-quinolil)-1,4,7,10,13-pentaoxatridecano; **LA**: ácido láurico; **LIX 984N**: 5-nonilsalicilaldoxima + 2-hidroxi-5-nonilacetofenonaoxima; **MTTT**: 5-metil-4[tiofen-2-il-metilen-amino]-3-tio-oxo-1,2,4-triazol-5-ona; **NBSND**: N,N-bis(salicilideno-naftileno-1,8-diamina; **PHDC**: dicarboxaldehído ftálico; **TBP**: tri-n-butil fosfato; **TIBPS**: sulfuro de tri-isobutilfosfina; **TT12C4**: tetratio-12-corona-4

Tabla II.A.6. Algunas aplicaciones analíticas de membranas líquidas soportadas en la determinación de metales pesados en aguas (diez últimos años)

Tipo de muestra	Agente extractante/disolvente	Metal	Referencia
Agua natural	22DD+LA/fenilhexano+tolueno	Cu(II), Pb(II), Cd(II), Zn(II)	Parthasarathy y col., 2003
Agua natural	D2EHPA/queroseno	Mn(II)	Soko y col., 2003
n.a.	D2EHPA/n-decanol	Fe(III), Cu(II)	Zhang y Gozzelino, 2003
n.a.	D2EHPA/queroseno	Ni(II)	Ata y col., 2004
Agua residual industrial	TEA/ciclohexanona	Co(II)	Bukhari y col., 2004
n.a.	LIX 84/queroseno	Cu(II)	Cooper y col., 2004
n.a.	CMPO/dodecano	Ce(III)	Fu y col., 2004
Agua natural y potable	D2EHPA/queroseno	Cd(II)	Marchese y Campderrós, 2004a
n.a.	Alamine 336/queroseno	Mo(VI)	Marchese y col., 2004b
Agua residual	2H-5-DBA/queroseno	Cu(II)	Molinari y col., 2004
Agua natural	22DD+LA/fenilhexano+tolueno	Cu(II)	Parthasarathy y col., 2004
Agua natural	22DD+LA/fenilhexano+tolueno	Pb(II), Cd(II)	Salaün y col., 2004
Agua natural	22DD+LA/fenilhexano+tolueno	Pb(II)	Slaveykova y col., 2004
n.a.	NTH/hexano	Pd(II)	Uheida y col., 2004
n.a.	Cyanex 921/xileno	Au(I), Au(III)	Alguacil y col., 2005a
Agua residual	Acorga M5640/Iberfluid (queroseno)	Cu(II)	Alguacil y Alonso, 2005b
n.a.	Cyanex 923/Solvesso 100 (hidrocarburos aromáticos)	Cd(II)	Alguacil y Tayibi, 2005c
n.a.	LIX 984/n-heptano	Cu(II)	Ata, 2005
Agua de mar	N-benzoil-N',N'-diheptadecil tiourea/decalina+cumeno	Hg(II)	Fontàs y col., 2005
Agua de mar	Lasalocid de sodio/NPOE	Cu(II)	Ndungù y col., 2005

Tabla II.A.6 (cont.). Algunas aplicaciones analíticas de membranas líquidas soportadas en la determinación de metales pesados en aguas (diez últimos años)

Tipo de muestra	Agente extractante/disolvente	Metal	Referencia
Agua natural	DbzDA18C6+OA/dihexiléter	Cu(II)	Romero y Jönsson, 2005
n.a.	TODGA/dodecano	Am(III)	Ansari y col., 2006
Agua natural	22DD+LA/fenilhexano + tolueno	Cd(II)	Bayen y col., 2006
n.a.	D2EHIBA/dodecano	U(VI)	Shailesh y col., 2006
n.a.	PhenS ₂ O/NPOE	Ag(I)	Shamsipur y col., 2006
	TT12C4/NPOE	Hg(II)	
Agua residual	LIX 54/queroseno	Cu(II)	Kocherginsky y Yang, 2007
n.a.	Aliquat 336, Chelex 100 y LIX 54/queroseno	Cd(II)	Lv y col., 2007
Agua de mar	Ditizona, OA/1-octanol	Cd(II)	Peng y col., 2007a
Agua residual de galvanoplastia	TEA/ciclohexanona	Ag(I)	Chaudry y col., 2008
n.a.	LIX 54/parafina	Cu(II)	Gameiro y col., 2008
Agua contaminada	Aliquat 336/dodecano	Cr(VI)	Güell y col., 2008
Agua natural	22DD-LA/tolueno+fenilhexano	Cu(II), Pb(II), Cd(II)	Bayen y col., 2009
Agua de río	DDTP/n-butilacetato+hexano	Cd(II)	Carletto y col., 2009
n.a.	TODGA/dodecano	U(VI)	Panja y col., 2009
n.a.	Cyanex 923/Exxsol D100	Cd(II)	Rathore y col., 2009
n.a.	DC18C6/tolueno	Ag(I)	Altin y col., 2010
n.a.	PC 88A/tolueno	Y(III)	Gaikwad y Rajput, 2010
n.a.	D2EHPA/queroseno	Cu(II)	Zhang y col., 2010a
n.a.	DP8R+Acorga M5640/Exxsol D100	Co(II)	Alguacil y col., 2011
n.a.	Calix[4]areno-bis-2,3-nafto-corona-6/(NPOE)+dodecano	Cs(I)	Kandwal y col., 2011
n.a.	DTBCH18C6/NPOE+dodecano	Sr(II)	Kandwal y col., 2012

Tabla II.A.6 (cont.). Algunas aplicaciones analíticas de membranas líquidas soportadas en la determinación de metales pesados en aguas (diez últimos años)

Tipo de muestra	Agente extractante/disolvente	Metal	Referencia
n.a.	D2EHPA/queroseno	Ni(II)	Pei y col., 2012a
n.a.	D2EHPA/queroseno	Nd(III)	Pei y col., 2012b
Agua residual de actividades fotográficas y de recubrimientos metálicos	TDDA/ciclohexano	Ag(I)	Rehman y col., 2012
Disoluciones preparadas de Ni-Co	Alamine 300/cloroformo	Ni(II), Co(II)	Surucu y col., 2012
n.a.	TOPO/dodecano	U(VI)	Kedari y col., 2013
n.a.	D2EHPA/queroseno	Co(II)	Vernekar y col., 2013
n.a.	D2EHPA, TOPO/cloroformo	Cd(II), Pb(II)	Azzoug y col., 2014

n.a.: no se ha aplicado el método en muestras reales

22DD: 1,10-didecil-1,10-diaza-18-corona-6; **2H-5-DBA**: 2-hidroxi-5-dodecilbenzaldehído; **Acorga M5640**: 5-nonilsalicilaldoxima; **Alamine 300**: tri-*n*-octilamina; **Aliquat 336**: cloruro de metiltricaprililamonio; **Chelex 100**: 7-(4-etil-1-metiloctil)-8-hidroxiquinoleína; **Cyanex 921**: óxido de tri-*n*-octilfosfina; **Cyanex 923**: mezcla de óxidos de trialkilfosfina; **CMPO**: óxido de octil(fenil)-*N,N*-diisobutilcarbamoilmetil fosfina; **D2EHIBA**: di(2-etilhexil)isobutiramida; **D2EHPA**: ácido di-(2-etilhexil) fosfórico; **DbzDA18C6**: 1,10-dibencil-1,10-diaza-18-corona-6; **DC18C6**: dicitclohexano-18-corona-6; **DDTP**: O,O-dietilditiofosfato de amonio; **DP8R**: ácido alquilfosfórico; **DTBCH18C6**: 4,4'(5')di-terc-butil-dicitclohexano-18-corona-6; **LA**: ácido láurico; **Lasalocid**: poliéteres carboxílicos ionóforos; **LIX 54**: 1-fenil-3-alkil 1,3-propanodiona; **LIX 84**: 2-hidroxi-5-nonilacetofenona oxima; **LIX 984** (LIX 84 + LIX 860): 2-hidroxi-5-nonilacetofenona oxima + 5-dodecilsalicilaldoxima; **NPOE**: o-nitrofenil octil éter; **NTH**: noniltiurea; **OA**: ácido oleico; **PC 88A**: mono-2-etilhexil éster del ácido 2-etilhexil fosfónico; **PhenS₂O**: aza-tioéter-corona con subunidades de 1,10-fenantrolina; **TDDA**: tri-*n*-dodecilamina; **TEA**: trietanolamina; **TODGA**: *N,N,N',N'*-tetraoctil-3-oxapentano diamida; **TOPO**: óxido de trioctilfosfina; **TT12C4**: tetratio-12-corona-4

Tabla II.A.7. Algunas aplicaciones analíticas de membranas líquidas de emulsión en la determinación de metales pesados en aguas (diez últimos años)

Tipo de muestra	Agente extractante/Disolvente	Metal	Referencia
n.a.	18C6/xileno	Cs(I)	El-Said y col., 2003
n.a.	TOPO/queroseno	Ga(III)	Kumbasar y Tutkun, 2004
n.a.	D2EHTPA/parafina	Zn(II)	Reis y Carvalho, 2004
Drenaje ácido de mina	LIX 860N-IC /queroseno	Cu(II)	Valenzuela y col., 2005a,b
Residuos fotográficos líquidos	Cyanex 302/queroseno	Ag(I)	Othman y col., 2006
Disoluciones de lixiviación sulfúrica	LIX 984N-C/queroseno	Cu(II)	Sengupta y col., 2006
n.a.	LIX 54/parafina	Cu(II)	Gameiro y col., 2007
n.a.	D2EHPA/queroseno	Pb(II)	Sabry y col., 2007
n.a.	D2EHPA/isododecano	Zn(II)	Fouad y Bart, 2008
Disolución equimolar Ni-Co	DBHQ/queroseno	Co(II)	Kumbasar y Şahin, 2008a
Disolución ácida de varios componentes metálicos	Alamine 336/queroseno	Cr(VI)	Kumbasar, 2008b
Disoluciones de lixiviación ácida de Zn	Aliquat 336/queroseno	Cd(II)	Kumbasar, 2008c
Disolución equimolar Ni-Co	DBHQ/queroseno	Ni(II)	Kumbasar, 2009a
	8-HQ/queroseno		Kumbasar y Kasap, 2009b
Lixiviados ácidos de tiocianato y metales	TOPO/queroseno	Co(II)	Kumbasar, 2009c
Lixiviados ácidos de tiocianato y metales	TIOA/queroseno	Co(II)	Kumbasar, 2009d
Disoluciones de lixiviación ácida de Zn	TOA/queroseno	Cd(II)	Kumbasar, 2009e
Disolución ácida de varios componentes metálicos	TOPO/queroseno	Cr(VI)	Kumbasar, 2009f
Agua residual	TIOA/tolueno, queroseno	Cd(II)	Mortaheb y col., 2009

Tabla II.A.7 (cont.). Algunas aplicaciones analíticas de membranas líquidas de emulsión en la determinación de metales pesados en aguas (diez últimos años)

Tipo de muestra	Agente extractante/Disolvente	Metal	Referencia
Agua residual de la industria farmacéutica	TOA, Aliquat-336/queroseno	Cr(VI)	Rajasimman y Sangeetha, 2009
Drenaje ácido de mina	LIX 860N-IC/queroseno	Cu(II)	Valenzuela y col., 2009
Agua residual	D2EHPA/hexano	Cu(II)	Chiha y col., 2010
Disolución ácida de varios componentes metálicos	Amberlita LA-2/queroseno	Cr(VI)	Kumbasar, 2010a
Disolución ácida de varios componentes metálicos	TBP/queroseno	Cr(VI)	Kumbasar, 2010b
Agua residual de la industria farmacéutica	TOA/queroseno	Cr(VI)	Rajasimman y Karthic, 2010
Agua residual	TBP/queroseno	Cr(III)	Zhao y col., 2010
n.a.	TOMAC/queroseno	Cr(VI)	Goyal y col., 2011
Agua residual sintética	Cyanex 923/queroseno	Cr(VI)	Nosrati y col., 2011
n.a.	TOA/queroseno	Cd(II)	Ahmad y col., 2012
n.a.	Aliquat 336/queroseno	Cr(VI)	Bhowal y col., 2012
Disolución equimolar Ni-Co	8-HQ/queroseno	Co(II)	Kumbasar, 2012
n.a.	PC 88A/queroseno	Cr(III)	García y col., 2013
Aguas residuales con iones cobre	LIX 984N-C/queroseno	Cu(II)	Zheng y col., 2013b

n.a.: no se ha aplicado el método en muestras reales

8-HQ: 8-hidroxiquinoleína; **18C6:** éter 18-corona-6; **Alamine 336:** tri-(C8-C10) amina; **Aliquat 336:** cloruro de metiltricaprililamonio; **Amberlita LA-2:** aminas secundarias; **Cyanex 302:** ácido bis(2,4,4-trimetilpentil)tiofosfínico; **Cyanex 923:** mezcla de óxidos de trialkilfosfina; **D2EHPA:** ácido di-(2-etilhexil) fosfórico; **D2EHTPA:** ácido di-(2-etilhexil) tiofosfórico; **DBHQ:** 5,7-dibromo-8-hidroxiquinoleína; **LIX 54:** 1-fenil-3-alkil 1,3-propanodiona; **LIX 984N-C:** mezcla equivolumen de LIX 860N-IC (5-nonilsalicilaldoxima) y LIX 84I-C (2-hidroxi-5-nonil-acetofenonaioxima); **LIX 860N-IC:** 5-nonilsalicilaldoxima; **PC 88A:** mono-2-etilhexil éster del ácido 2-etilhexil fosfónico; **TBP:** tributilfosfato; **TIOA:** tri-iso-octil amina; **TOA:** trioctilamina; **TOMAC:** cloruro de tri-n-octilmetilamonio; **TOPO:** óxido de trioctilfosfina

Además de estas aplicaciones, que se encuentran dentro del campo de la Química Analítica o el Análisis Ambiental donde se ha destacado la determinación de trazas metálicas en medios acuosos, los sistemas de membranas líquidas han sido aplicados también en áreas como Ingeniería Química, Ingeniería Biomédica, Biotecnología, Fisiología o Química Inorgánica. Su campo de aplicación es bastante amplio, y algunas aplicaciones a destacar son las siguientes:

- Eliminación de compuestos orgánicos.
- Separaciones de gases.
- Recuperación selectiva de productos de fermentación.
- Preconcentración de compuestos orgánicos para su determinación en muestras biológicas o medioambientales.
- Aplicaciones medioambientales destinadas al tratamiento de aguas residuales.
- Aplicaciones biomédicas: aislamiento, eliminación y determinación de drogas, compuestos tóxicos y compuestos orgánicos como fenoles en fluidos biológicos (como plasma y orina).
- Análisis de alimentos: como la separación de triazinas en zumos y aceites, y la recuperación de compuestos aromáticos a partir de frutas.
- En la industria petrolífera: para la separación de compuestos presentes en aceites, combustibles y otros hidrocarburos.

II.A.3. El plomo en el medio ambiente

La riqueza de plomo en la corteza terrestre se estima alrededor de un 0,002%. Este metal raramente se encuentra en su estado fundamental, siendo frecuente su presencia en numerosos minerales, destacando la galena (PbS), la cerusita (PbCO_3), la crocoita (PbCrO_4) y la piromorfita ($\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$), entre los cuales la galena es el mineral más explotado para su obtención. Sus estados de oxidación posibles son +2 y +4, mostrándose en la mayoría de sus compuestos en estado +2. Las sales de bromuro y cloruro de este metal son ligeramente solubles en agua, mientras que las sales básicas y el carbonato son prácticamente insolubles.

El plomo puede presentarse de forma natural en el medio ambiente. Así, algunos suelos pueden presentar concentraciones elevadas, debido a que las rocas subyacentes son ricas en dicho elemento. En las aguas, el contenido natural de plomo suele ser bajo, siendo en el aire donde se encuentran las mayores concentraciones (en forma de polvo o vapor) como consecuencia de emisión de volcanes. Estas aportaciones

naturales resultan prácticamente insignificantes en relación a las derivadas de las actividades humanas [Baird y Cann, 2005]. La mayoría de las zonas con altos niveles en contenido de plomo han resultado estar ubicadas en asentamientos urbanos, los cuales han experimentado un amplio desarrollo en cuanto a industrias, municipios, residencias y densidad de medios de transporte. Así, la contaminación causada por este metal pesado se encuentra fuertemente asociada a actividades antropogénicas [Duzgoren-Aydin, 2007].

Es un metal muy interesante desde un punto de vista industrial, ya que es relativamente resistente a ácidos fuertes (como el ácido sulfúrico y clorhídrico) y a bases nitrogenadas. Ello hace que sea un metal muy común en el campo de la metalurgia, con múltiples aplicaciones. En todo proceso de fabricación va implícita la generación de determinados residuos, los cuales son vertidos de forma indebida a las aguas y a la atmósfera. Aunque las técnicas modernas y un mayor control en la gestión de residuos han minimizado estas emisiones, aún se siguen llevando a cabo numerosos vertidos.

La mayor preocupación en cuanto a emisiones de plomo estuvo asociada con el uso de gasolinas con plomo como aditivo antidetonante. El empleo de este combustible de vehículos provocó la liberación de grandes cantidades de este metal a la atmósfera. Otro foco importante de contaminación ha sido el uso de determinadas pinturas, donde el plomo presente en su composición pasó a formar parte de suelos y aguas. Una vez conocida la toxicidad del plomo, así como su presencia en determinados compuestos, este metal empezó a ser sustituido por otras sustancias no perjudiciales. No obstante, al ser -al igual que el resto de metales pesados- un elemento no degradable, muchas de las cantidades vertidas con anterioridad a estas medidas siguen siendo responsables del estado actual de la contaminación de muchos ecosistemas [Baird y Cann, 2005; Ghazi y Millette, 2005; Huang y col., 2012b].

Entre las principales aplicaciones actuales del plomo destacan la fabricación de baterías, revestimiento de cables eléctricos, redes de tuberías, tanques y aparatos de rayos X. Debido a su elevada densidad y propiedades nucleares, puede emplearse como blindaje protector de materiales radiactivos. Además, numerosas aleaciones son empleadas en soldaduras, metal tipográfico y cojinetes metálicos [Ghazi y Millette, 2005].

En cuanto a los efectos causados por envenenamiento por plomo, son de destacar fundamentalmente diversos trastornos neurológicos, como disfunción cognitiva, retardo mental, síndrome de déficit de atención o encefalopatía, entre otros. Además, puede producir sordera, ceguera, enfermedades cardiovasculares, daños renales y deficiencia en el desarrollo físico cuando las concentraciones en el organismo son altas.

Todos los posibles efectos son especialmente alarmantes en niños y en mujeres embarazadas, donde el plomo puede afectar al feto [Meyer y col., 2008; Chen y col., 2012; Crichton, 2012b].

Debido a la gran preocupación desde el punto de vista medioambiental y de la salud que supone la presencia de este metal, sobre todo en el organismo de niños, en el año 2012 los Estados Unidos decidieron modificar el valor de referencia de plomo en sangre de niños. Así, se disminuyó el valor previamente establecido ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) hasta un nuevo nivel en sangre correspondiente a $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Asimismo, el reestablecimiento de nuevos niveles de referencia o "niveles de preocupación" en el medio ambiente, constituye una meta continua [Lucas y col., 2014; CDC, 2012].

II.A.3.1. El plomo en los ecosistemas acuáticos

La presencia de plomo en los ecosistemas acuáticos se debe fundamentalmente a los vertidos industriales realizados directamente al medio, los cuales contienen este metal, tanto en forma disuelta como particulada. Otra posible vía de entrada de este contaminante puede ser por deposición de las partículas de plomo que se encuentran formando parte de la atmósfera. Éstas pueden depositarse sobre la superficie de la tierra y posteriormente ser arrastradas por acción del viento o lluvia hacia las masas de agua, o bien pueden depositarse directamente sobre la superficie del agua entrando a formar parte del medio [Sabin y col., 2006]. No obstante, a pesar de que las actividades antropogénicas constituyen una fuente de entrada fundamental de Pb en los medios acuáticos, éste se considera un componente natural de los ecosistemas marinos. Así, suele presentarse en bajas concentraciones en aguas limpias, sedimentos y tejidos de plantas y animales marinos.

Las concentraciones de este metal en los ecosistemas acuáticos dependen del tipo de aguas, la ubicación de las mismas y la presencia de influencia antropogénica. De forma orientativa, las concentraciones de plomo en agua de mar (costeras y oceánicas) pueden variar desde $4 \cdot 10^{-5}$ - $9,00 \mu\text{g L}^{-1}$, mientras que en ríos oscilan entre $0,13$ - $60,0 \mu\text{g L}^{-1}$ [Crompton, 2007].

Respecto al comportamiento del plomo en el medio acuático, este elemento puede presentarse en forma disuelta, coloidal o bien asociarse a la materia particulada. En aguas de estuario o costeras, a menudo son mayores las concentraciones de plomo asociadas a la materia particulada que el contenido en forma disuelta o coloidal. En agua de mar, los compuestos mayoritarios (a valores normales de pH y salinidad para estas aguas) son los carbonatos, cloruros e hidróxidos (PbCO_3 , PbCl_n , PbOH_n). Se estima que menos del 5% del plomo inorgánico se encuentra en forma de ión libre Pb^{2+} , el

cual constituye la forma más tóxica y biodisponible para los organismos marinos. En los estuarios y aguas costeras, la mayoría del Pb disuelto se encuentra formando complejos con ligandos o materia orgánica disuelta o coloidal [Neff, 2002].

Por otra parte, este metal puede encontrarse formando parte de los sedimentos en el medio acuático, bien por origen natural o bien por la sedimentación final del metal particulado previamente suspendido en la columna de agua. Frecuentemente, en sedimentos anóxicos, el plomo se encuentra en estado de oxidación +2, el cual reacciona con el sulfuro inorgánico presente en los sedimentos para formar sulfuros de plomo altamente insolubles. Por tanto, la forma predominante de este metal en los sedimentos es en forma de sulfuros o bien formando parte de la fracción residual, es decir, la fracción menos biodisponible [Neff, 2002]. En algunos casos, el metal depositado puede volver a redisolverse mediante cambios en las condiciones ambientales del medio. Hay que destacar la participación de determinadas bacterias que, de forma directa o indirecta, pueden encontrarse involucradas en estos procesos de lixiviación metálica en los sedimentos [Gadd, 2004], así como la presencia de iodometano en las aguas marinas, producido fundamentalmente por algas y plancton. El iodometano se genera relativamente a altas concentraciones en zonas donde la productividad de la biomasa es elevada. Este producto disuelve algunos sulfuros metálicos insolubles (como PbS), provocando la redisolución del Pb en la columna de agua y, por tanto, aumentando su biodisponibilidad. Además, puede metilar las sales y complejos de Pb para formar di, tri y tetrametil plomo por reacción de estos compuestos de plomo con iodometano, siendo estos últimos compuestos más tóxicos que los compuestos inorgánicos [Minganti y col., 2007].

Aún en el caso de que las concentraciones de plomo vertidas en ecosistemas marinos fuesen bajas (nivel de trazas) y las formas predominantes fueran las menos biodisponibles, es difícil establecer el destino final de estos contaminantes. Estas formas químicas pueden evolucionar según las condiciones físico-químicas del medio, hasta convertirse en compuestos realmente disponibles y peligrosos para el medio. Además, cuando estos contaminantes entran a formar parte de los organismos marinos su concentración puede verse aumentada a través de procesos de biacumulación y biomagnificación, elevándose potencialmente la concentración de este contaminante en la cadena alimentaria y entrañando un alto riesgo para la salud humana [Callender y Rice, 2000].

II.A.4. Métodos de determinación de plomo en aguas naturales

Dada la gran importancia que alberga la presencia de plomo en los ecosistemas acuáticos, se han desarrollado a lo largo de los años diversos métodos para su determinación. Debido al bajo nivel de concentración que suele presentar el plomo en las aguas, se requiere el uso de técnicas analíticas altamente sensibles que permitan realizar estas determinaciones de un modo satisfactorio. Además, algunas matrices pueden introducir interferencias que afecten a la medida de este metal, o bien, causar problemas en los equipos de medida si las muestras se introducen directamente. Todo ello implica que, en numerosas ocasiones, sea necesaria la integración de una etapa previa de separación/ preconcentración antes de la medida [Korn y col., 2006].

A continuación se describen brevemente algunos métodos empleados para el análisis de plomo en muestras acuosas.

II.A.4.1. Determinación de plomo en aguas con etapa previa de preconcentración

II.A.4.1.1. Determinación de plomo en aguas tras preconcentración mediante extracción líquido-líquido

Los métodos espectrofotométricos no tienen suficiente sensibilidad como para determinar las concentraciones usuales de plomo en las aguas naturales ($\mu\text{g L}^{-1}$ o ng L^{-1}). Uno de los procedimientos más ampliamente utilizados, como etapa de preconcentración, consiste en realizar una extracción líquido-líquido mediante el uso de agentes extractantes de distinta naturaleza disueltos en disolventes orgánicos, donde el metal reacciona selectivamente con el reactivo extractante en la fase orgánica, formando un complejo coloreado que será determinado por espectrofotometría de absorción molecular [Bale y col., 1995; Argekar y Shetty, 1998; Ninan y col., 1999; Shilimkar y Anuse, 2002].

En otros casos, tras llevarse a cabo la extracción líquido-líquido, el complejo formado puede ser determinado directamente en el extracto orgánico, o bien puede ser necesario un posterior proceso de reextracción, por lo general en medio ácido. La aparición de las técnicas de espectrometría atómica ha hecho posible realizar determinaciones más sensibles de bajas concentraciones de plomo en medio acuoso [Batterham y col., 1997; Carasek y col., 2002; Ndungù y col., 2003].

En sus comienzos, estos procedimientos de extracción con disolventes se efectuaban en modo discontinuo; sin embargo, fueron surgiendo técnicas como las membranas líquidas (donde los procesos de extracción y reextracción se llevaban a cabo en un solo paso), así como el desarrollo e implementación de métodos continuos como los sistemas de inyección en flujo (Flow Injection Analysis, FIA) y/o de inyección secuencial (Sequential Injection Analysis, SIA), con el fin de automatizar estos análisis y emplear menos tiempo en los estudios, así como menores cantidades de reactivos y disolventes (muchos de ellos tóxicos) [Anthemidis, 2008].

II.A.4.1.2. Determinación de plomo en aguas tras preconcentración mediante extracción sólido-líquido

Esta técnica de preconcentración mediante extracción sólido-líquido consiste generalmente en la utilización de un soporte (generalmente resinas empaquetadas en columnas, filtros o discos) donde posteriormente se inmoviliza un determinado reactivo, el cual formará complejo con el plomo al ponerse ambos en contacto. El metal es posteriormente eluido destruyendo el complejo formado en el medio sólido y determinado por espectrofotometría de absorción molecular UV-visible u otra técnica instrumental adecuada, como la espectrofotometría de absorción atómica con llama (Flame Atomic Absorption Spectrometry, FAAS) o con horno de grafito (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, GFAAS). Entre los soportes más empleados se encuentran la Amberlita XAD-2 [Brajter y col., 1988; Saxena y col., 1994; Saxena y col., 1995; Saxena y Singh, 1997; Jain y col., 1997; Abollino y col., 1998; Kumar y col., 2000a,b; Tewari y Singh, 2002], Amberlita XAD-4 [Issiki y col., 1987; Kim y col., 2005; Islam y col., 2010], Amberlita XAD-7 [Compañó y col., 1994; Hoshi y col., 1994; Tewari y Singh, 2002; Draa y col., 2004; Divrikli y col., 2007], Amberlita XAD-16 [Prabhakaran y Subramanian, 2003a,b; Narin y col., 2003; Sharma y Pant, 2009], sílica gel [Hosten y Welz, 1999; Kocjan, 1999; Bernal y col., 2000; Karve y Rajgor, 2007; Liu y Liang, 2008], celulosa [Akama y col., 2003; Gurnani y Singh, 2004], o carbón activo [Uzawa y col., 1998; Narin y col., 2000; Ghaedi y col., 2007; Ensafi y Shiraz, 2008; Ghaedi y col., 2008a,b; Li y col., 2009; Monser y Adhoum, 2009], entre otros.

En general, las extracciones en fase sólida que emplean agentes complejantes sobre distintos soportes, como los citados en el párrafo anterior, han resultado ser más selectivas que aquellas que se basan en el empleo de intercambiadores iónicos. Los agentes complejantes consisten en ligandos orgánicos que contienen grupos funcionales activos que reaccionan y forman quelatos de forma selectiva con determinados iones metálicos de interés. Estos compuestos se incorporan a los distintos soportes mediante modificación química [Prabhakaran y Subramanian, 2003a].

II.A.4.1.3. Determinación de plomo en aguas tras preconcentración mediante intercambio iónico

Otro método de preconcentración y posterior determinación de plomo en aguas naturales ha sido posible mediante procesos de intercambio iónico a partir de zeolitas [Seijó Echevarría y col., 1997; Turan y col., 2005; Stylianou y col., 2007; Tao y col., 2010; Kim y col., 2013a]. Estos materiales promueven el intercambio iónico entre metales tóxicos por otros más benignos (como Na, K, Ca o Mg), de modo que el balance de cargas en la superficie de la zeolita quede totalmente equilibrado. Esta característica otorga a las zeolitas unas propiedades muy interesantes para ser aplicadas en la eliminación de metales pesados y otros compuestos existentes en los efluentes industriales y otras aguas de desecho [Pansini, 1996; Koukouzas y col., 2010; Wang y Peng, 2010e]. Otra característica a destacar es que las zeolitas, una vez utilizadas, pueden ser regeneradas y pueden reutilizarse [Katsou y col., 2011]. El posterior análisis del eluato se efectúa mediante una gran variedad de técnicas instrumentales, tales como: espectrofotometría de absorción atómica, espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta-visible, espectroscopía de emisión molecular, concretamente quimioluminiscencia molecular, espectroscopía de masas, e incluso por activación neutrónica.

La resina quelatante Chelex-100 ha sido muy empleada en procesos de preconcentración y separación de plomo en aguas naturales [Bae y col., 1998; Mesquita y col., 2004; Soyak, 2004; Nomngongo y col., 2013]. La resina Chelex-100 [Riley y Taylor, 1968; Florence y Batley, 1975] está formada por una red de estireno, con grupos funcionales iminodiacetato ($\text{OOC-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-COO}^-$), generalmente unidos a protones u otros iones intercambiables. Esta resina permite separar las especies lábiles (iones metálicos libres o débilmente complejados) de las más inertes (especies metálicas asociadas a materia coloidal orgánica e inorgánica). De esta manera, la forma iónica del metal más fácilmente retenida por la resina es la fracción más biodisponible, que en el caso de los metales pesados suele ser la más tóxica. Otras resinas que contienen el grupo ácido iminodiacético son la Amberlita IRC-748 (IRC-718), Purolita S-930 y Lewatit TP-207. Además de estos tipos de resina, destacan las que contienen ácido aminofosfónico o amidoxima como grupos funcionales [Ling y Juang, 2005]. No obstante, debido a la baja selectividad de las resinas de intercambio iónico, surgieron otras resinas semejantes con propiedades quelatantes, las cuales suelen poseer grupos ricos en O, N, S y P, que tienden a coordinar a diferentes iones metálicos. Las resinas quelatantes presentan mayor selectividad que las que se suelen utilizar en los procesos de extracción en fase sólida o las resinas de intercambio catiónico, debido a su triple función como intercambiador iónico, agente quelatante y adsorbente [Tokalioğlu y col., 2009; Manivannan y Biju, 2011; Turan y col., 2012].

Este tipo de metodología permite la fácil implementación de sistemas de análisis por inyección en flujo (FIA) que ofrecen las ventajas de minimizar el gasto de reactivos, evitar la manipulación de la muestra, el riesgo de contaminación de las mismas, y emplear menores tiempos de análisis, entre sus principales características [Bravo-Sánchez y col., 2001; Huang y col., 2004; Wang y col., 2006b].

II.A.4.2. Determinación de plomo en aguas por Voltamperometría de Redisolución

Esta técnica ha sido una de las más empleadas en los últimos años en el campo del análisis medioambiental. La mayoría de sus características son ventajosas, destacando su capacidad para analizar metales en muestras acuosas salinas, como agua de mar o de estuario. Se solucionan así las limitaciones que presentan otras técnicas instrumentales para las que la introducción de muestras con este tipo de matriz salina resulta inviable. Hay que indicar que las técnicas de Voltamperometría de Redisolución contienen una etapa de preconcentración que tiene lugar en la misma celda de medida, evitando así manipulaciones y posibles contaminaciones de la muestra.

Los métodos de redisolución más comunes son la voltamperometría de redisolución anódica (Anodic Stripping Voltammetry, ASV), de redisolución catódica (Cathodic Stripping Voltammetry, CSV) y de redisolución catódica adsorptiva (Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry AdCSV).

En el campo de la voltametría de redisolución se han desarrollado y aplicado distintos tipos de electrodos de trabajo, donde el más empleado ha sido y sigue siendo principalmente el de gota de mercurio. A pesar de haber sido cuestionado por su carácter tóxico para la salud humana, presenta ciertas ventajas entre las que destaca sobre todo la facilidad para producir un nuevo electrodo generando una nueva gota de mercurio, sin interferencias causadas por medidas previas y evitando así posibles contaminaciones por muestras anteriores. Esto da como resultado la obtención de curvas de intensidad-potencial bastante reproducibles. El electrodo de mercurio permite la reducción de una gran cantidad de especies en medio ácido, debido a que presenta una elevada sobre-tensión para la reducción de los iones H^+ , lo que amplía considerablemente el intervalo de potencial de aplicación hacia valores más negativos que los que ofrecen otros electrodos.

De esta forma, se ha aplicado la voltamperometría de redisolución anódica (ASV) con electrodo de gota de mercurio para determinaciones simultáneas en muestras acuosas de distinta naturaleza de varias especies metálicas (entre ellas el Pb), cuyos potenciales de medida se incluyen en dicho intervalo de medición [Gillain y col., 1979;

Lee y Lo, 1994; Barbeira y Stradiotto, 1997; Vicente-Martorell y col., 2009; Durán y Nieto, 2012].

No obstante, dentro de la voltamperometría de redisolución anódica, es frecuente el empleo de diversos tipos de electrodos modificados con el fin de aumentar la sensibilidad y selectividad de las determinaciones [Wojciechowski y Balcerzak, 1991; Gunasingham y Dalangin, 1991; Dalangin y Gunasingham, 1994; Zen y Ting, 1996; Baldo y col., 1998; Fischer y van den Berg, 1999; Dragoe y col., 2006; Armstrong y col., 2010; Annibaldi y col., 2011; Zhao y col., 2013b]. Uno de los sustratos más utilizados es el carbono en forma de carbono vitrificado, grafito pirolítico o el polvo de grafito impregnado en ceras o materiales poliméricos.

Se ha aplicado la voltamperometría de redisolución anódica de onda cuadrada (Square Wave Anodic Stripping Voltammetry, SWASV) para el análisis de plomo en muestras de agua de río y agua potable. La celda de medida contiene un electrodo de plata (disco rotativo) y un contraelectrodo de referencia también de plata, el cual genera iones de plata los cuales se codepositan junto con el plomo en el electrodo de trabajo. A diferencia de las medidas por ASV convencionales, las características más novedosas de este sistema son que está formado únicamente por dos electrodos y, además, no es necesario eliminar el oxígeno de la celda, es decir, no se requiere suministro de nitrógeno. La razón es que el oxígeno disuelto en la celda se reduce hasta agua en el electrodo de plata al mismo potencial al cual se produce la electrodeposición del plomo [Brand y col., 1997; Kirowa-Eisner y col., 1999; Bonfil y Kirowa-Eisner, 2002].

Otra modalidad dentro de la voltametría de redisolución es la voltamperometría de redisolución catódica adsortiva (AdCSV), que ha sido una de las más utilizadas para la determinación directa de trazas de plomo en muestras de agua reales, mediante el empleo de reactivos orgánicos. El reactivo orgánico forma un complejo metálico con el ión metálico, el cual se deposita o adsorbe sobre la superficie del electrodo de mercurio, desde donde posteriormente será redissuelto. La ventaja de este procedimiento es un aumento de sensibilidad, con límites de detección por debajo de 10^{-10} - 10^{-11} mol L⁻¹, empleando tiempos de preconcentración cortos, así como un aumento en la selectividad de la determinación.

De esta manera ha podido determinarse la concentración de plomo disuelto o lábil en muestras reales de agua de mar, mediante el empleo del reactivo orgánico naranja de xilenol, tras una previa digestión por UV para la eliminación de materia orgánica, alcanzándose un límite de detección de 6 ng L⁻¹ y resultados bastante satisfactorios para las muestra de mar analizadas, las cuales contenían plomo a muy bajas concentraciones (ng L⁻¹) [Wu y Batley, 1995]. Otro método desarrollado y aplicado a

muestras reales de agua de mar y agua potable se basa en la adición del ácido morín-5'-sulfónico (MSA) como ligando y dodecilsulfato sódico (SDS) para mejorar la señal. El método fue validado satisfactoriamente en presencia de otros iones metálicos, presentando un límite de detección de $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ [Arancibia y col., 2009]. La 2-acetilpiridina saliciloilhidrazona (2-APSH) fue otro de los reactivos aplicados para la determinación directa de plomo. Tanto la síntesis del reactivo como el desarrollo de este método de análisis fueron llevados a cabo en nuestro grupo de investigación. El método propuesto fue validado con éxito mediante el empleo de una muestra de referencia de estuario y aplicado posteriormente a muestras reales de agua de mar de aproximadamente $4 \mu\text{g L}^{-1}$ de concentración para este elemento, siendo el límite de detección $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ [Espada-Bellido y col., 2009a]. En la Tabla II.A.8 se observan estos y otros ejemplos de la aplicación de la técnica de voltamperometría de redisolución catódica adsortiva a la determinación de plomo en muestras reales.

Tabla II.A.8. Ligandos orgánicos aplicados en la determinación de plomo en aguas naturales mediante voltamperometría de redisolución catódica adsortiva (AdCSV)

Ligando orgánico	Tipo de muestra	Referencia
8-hidroxiquinoleína	Agua de mar	van den Berg, 1986
o-cresoltalexon (Púrpura de ftaleína)	Agua potable	Wang y col., 1993
Naranja de xilenol (XO)	Agua de mar	Wu y Batley, 1995
Azul calceína (CB)	Agua de río, mineral y potable	Yokoi y col., 1995
Dimetilglioxima (DMG) y 8-hidroxiquinoleína	Agua de mar	Colombo y van den Berg, 1997
Azul calceína (CB)	Agua de lago	Fischer y van den Berg, 2001
Rojo de pirogalol (PGR)	Agua de río y agua potable	Ensafi y col., 2003
Morina	Agua potable	Shams y col., 2004
Naranja de xilenol (XO)	Agua de río y agua potable	Ensafi y col., 2006
Ácido morín-5'-sulfónico (MSA)	Agua de mar y agua potable	Arancibia y col., 2009
2-acetilpiridina saliciloilhidrazona (2-APSH)	Agua de mar	Espada-Bellido y col., 2009a
2-hidroxibenzaldehído benzoilhidrazona (2-HBBH)	Agua sintética	Espada-Bellido y col., 2009b
Rojo de pirogalol (PGR)	Agua mineral	Nagles y col., 2012

Capítulo II. B

Parte experimental

II.B.1. Configuración de la membrana líquida de volumen empleada para la preconcentración de plomo

Con objeto de preconcentrar trazas metálicas de Pb(II) disueltas en aguas naturales y, a su vez, separar el analito de la matriz y sus posibles interferencias, se decidió abordar el estudio de la transferencia del ión plomo diseñando una membrana líquida que facilitara el transporte mediante la adición de una tiosemicarbazona como agente extractante. Además, se propuso el empleo de la espectroscopía atómica como técnica de detección por ser sencilla, común en los laboratorios y económica.

Para ello, se empleó una membrana líquida de volumen (MLV o BLM). En este tipo de membranas, la celda de preconcentración más utilizada consta de dos vasos concéntricos de distinto volumen (Figura II.B.1). En el compartimento exterior, de mayor capacidad, se coloca lo que se denomina la **fase acuosa cargada (V_C)** con la especie a transferir a la **fase acuosa receptora (V_R)**, que se sitúa en el vaso interior. La disolución orgánica empleada como **membrana líquida (V_O)**, de menor densidad que las disoluciones acuosas utilizadas, queda sobre éstas poniéndolas en contacto, posibilitando así el transporte del metal desde la fase cargada hacia la fase receptora. La relación de volúmenes entre la fase cargada externa y la fase receptora interna determina el factor de preconcentración del sistema de membrana líquida.

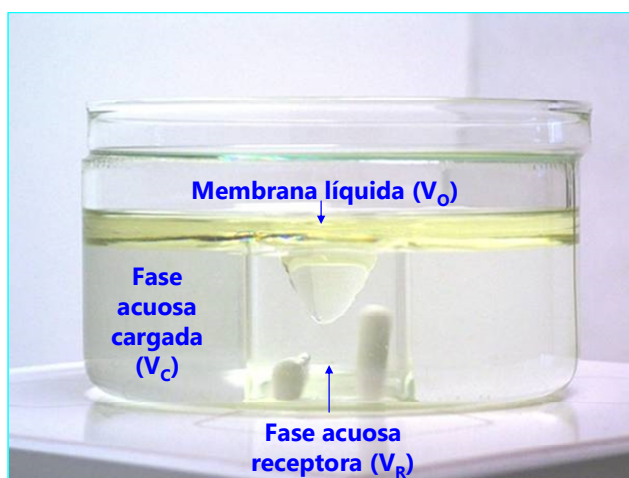


Figura II.B.1. Celda de membrana líquida de volumen empleada

Con este tipo de celda se realizan los procesos de extracción-reextracción del analito en continuo. El metal disuelto M^{n+} difunde desde la fase cargada hacia la interfase que forma con la membrana líquida donde reacciona con el reactivo que ejerce el papel de agente extractante, formando un complejo soluble en la fase orgánica. El complejo metálico formado llega hasta la interfase membrana-fase receptora, donde éste se descompone por la acción de una tercera especie implicada en el proceso. Es frecuente que estas especies sean los protones presentes en un medio ácido, que se unen al extractante produciendo el proceso opuesto, mientras se libera el metal en la fase receptora. Este proceso de contratransporte de protones permite la regeneración del transportador que regresa a la fase orgánica. La fuerza impulsora de la transferencia de materia se debe al gradiente de concentración de protones entre las dos fases acuosas, permitiendo el transporte de los iones metálicos incluso en contra de su gradiente de concentración (Figura II.B.2).

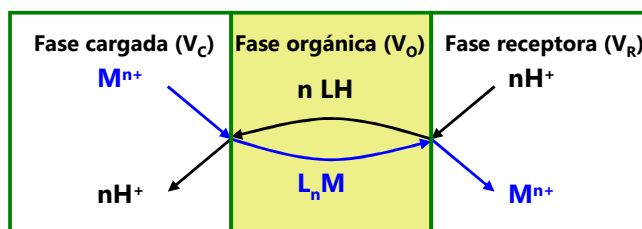


Figura II.B.2. Transporte del ión metálico a través de una membrana líquida mediante contratransporte acoplado (M=metal; L=agente transportador disuelto en la fase orgánica)

En este estudio, la celda de preconcentración utilizada se fabricó en cuarzo para evitar fenómenos de adsorción-precipitación del metal en la superficie de materiales como el vidrio. En la Figura II.B.3 se detallan las dimensiones de la misma.

Los volúmenes de las fases acuosas (cargada y receptora) y de la fase orgánica dependen principalmente de las dimensiones de la celda empleada para los estudios. Además, deben efectuarse ensayos previos para comprobar que los volúmenes son adecuados y no se producen mezclas entre las diferentes fases. Tras estos ensayos, los volúmenes empleados fueron 250 mL de disolución de fase acuosa cargada frente a 11 mL de disolución de fase acuosa receptora. Dichos volúmenes determinaron el factor de preconcentración de la celda (FPC), el cual fue de 22,73 (250/11). Por último, hay que destacar que se empleó la menor cantidad de membrana líquida posible, sin dificultar el contacto entre las interfases, siendo este volumen de 80 mL.

Durante los experimentos realizados con la membrana líquida se favoreció el transporte mediante agitación magnética, facilitándose así el proceso de difusión y transferencia del analito. La celda se cubrió con una placa del mismo material, con el fin de evitar una posible evaporación del disolvente orgánico contenido en el interior de la celda y/o contaminaciones procedentes de la atmósfera exterior.

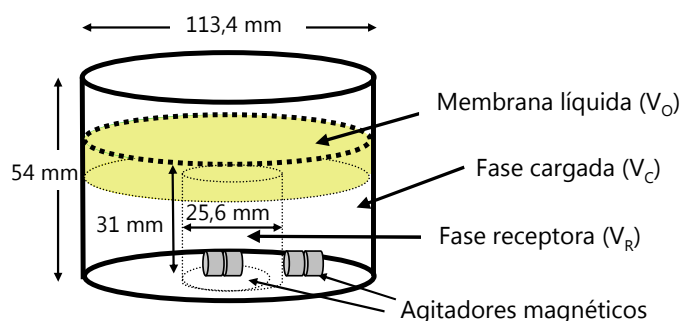


Figura II.B.3. Dimensiones de la celda de membrana líquida de volumen empleada (factor de preconcentración de la celda (FPC)=22,73)

II.B.2. Selección del agente transportador y naturaleza de la membrana líquida

Para la elección del agente transportador y del disolvente orgánico adecuados, que conforman la membrana líquida, se realizaron una serie de estudios previos. Por un lado, se estudió la solubilidad de varios reactivos transportadores en diversos disolventes orgánicos útiles para su aplicación como membrana líquida; y por otro, su capacidad para ser aplicados en los procesos de extracción-reextracción que tienen lugar a través de la membrana líquida.

Según la configuración del sistema de membrana líquida seleccionado, el disolvente orgánico a determinar tiene que ser menos denso que las fases acuosas empleadas; y a su vez, como se propone utilizar un mecanismo de transporte asistido, el reactivo orgánico transportador debe ser soluble en el disolvente orgánico elegido y permitir la permeabilidad y difusión del analito a través de la membrana.

Así, para seleccionar tanto el reactivo como el disolvente se realizaron diversos estudios previos de solubilidad de varias hidrazonas y derivados de éstas (reactivos sintetizados en el propio grupo de investigación) en diferentes disolventes orgánicos, tales como hexanol, octanol y tolueno (Tabla II.B.1).

Tabla II.B.1. Solubilidad de algunas hidrazonas en distintos disolventes orgánicos menos densos que el agua

Reactivo orgánico	Carácter soluble del reactivo orgánico		
	Hexanol	Octanol	Tolueno
2-APBH	SI	NO	SI
3-APBH	NO	SI	SI
APBBH	NO	NO	NO
BABH	SI	NO	SI
DABBH	SI	SI	NO
DAPBBH	NO	NO	NO
FBH	SI	SI	SI
2-HBBH	SI	SI	SI
2-HBET	SI	SI	SI
2-HBFH	SI	SI	SI
2,5-HBFT	SI	NO	NO
NABH	NO	SI	SI
VBH	NO	SI	NO
VPH	SI	SI	SI
VSH	NO	NO	NO

2-APBH: 2-acetilpiridina benzoilhidrazona; **3-APBH:** 3-acetilpiridina benzoilhidrazona; **APBBH:** acetilfenilbenzaldehído benzoilhidrazona; **BABH:** benzaldehído benzoilhidrazona; **DABBH:** diacetilbenzaldehído benzoilhidrazona; **DAPBBH:** diacetilfenilbenzaldehído benzoilhidrazona; **FBH:** fenilbenzoilhidrazona; **2-HBBH:** 2-hidroxibenzaldehído benzoilhidrazona; **2-HBET:** 2-hidroxibenzaldehído-N-etiltiosemicarbazona **2-HBFH:** 2-hidroxibenzaldehído fenilhidrazona; **2,5-HBFT:** 2,5-hidroxibenzaldehído fenil tiosemicarbazona; **NABH:** naftaldehído benzoilhidrazona; **VBH:** o-vanillina benzoilhidrazona; **VPH:** o-vanillina fenilhidrazona; **VSH:** o-vanillina saliciloilhidrazona

Reactivos como la fenilbenzoilhidrazona (FBH), 2-hidroxibenzaldehído benzoilhidrazona (2-HBBH), 2-hidroxibenzaldehído-N-etiltiosemicarbazona (2-HBET), 2-hidroxibenzaldehído fenilhidrazona (2-HBFH) y o-vanillina fenilhidrazona (VPH), mostraron ser solubles en los tres disolventes orgánicos estudiados en cantidades adecuadas para los procesos de transporte de trazas metálicas.

Debido al gran interés suscitado por las tiosemicarbazonas como ligandos quelatantes de diversos iones metálicos, se eligió el compuesto 2-hidroxibenzaldehído-N-etiltiosemicarbazona (2-HBET) para sucesivos estudios. Entre los disolventes ensayados, se eligió el tolueno ya que, teniendo parecida densidad, presentaba menor solubilidad en agua y una constante dieléctrica mucho más baja que el hexanol y el octanol. Así, la membrana líquida sería poco miscible con las fases acuosas cargada y receptora (baja solubilidad en agua) y los compuestos apolares serían mejor extraídos en la fase orgánica (baja constante dieléctrica). Estos valores se muestran en la Tabla II.B.2.

Tabla II.B.2. Datos de densidad, solubilidad en agua y constante dieléctrica para hexanol, octanol y tolueno [<http://www.chemspider.com>; <http://www.stenutz.eu> (Home page of R. Stenutz, Stockholm University)]

Propiedades	Disolvente orgánico		
	Hexanol	Octanol	Tolueno
Densidad (g mL^{-1})	0,814	0,827	0,867
Solubilidad en agua (g L^{-1} a 25 °C)	6,885	0,814	0,573
Constante dieléctrica	13,30	10,30	2,38

Una vez seleccionado tanto el reactivo orgánico empleado como agente extractante (2-HBET) como el disolvente orgánico (tolueno) que constituían la membrana líquida de volumen, se realizaron estudios previos para evaluar la respuesta y eficacia de este sistema en la preconcentración y separación de trazas metálicas de interés medioambiental como Ti(I) , Pb(II) , V(V) , Ti(IV) , Ag(I) y Cr(III) .

Estos estudios previos basados en los procesos de extracción-reextracción se realizan frecuentemente en tubos de ensayo, donde se adiciona una cantidad de agua desionizada Milli-Q junto con un pequeño volumen de disolución reguladora a distintos valores de pH, además de la disolución de los distintos metales que se quieren examinar. Posteriormente, se añade sobre cada tubo de ensayo unos mililitros de disolución de reactivo en el disolvente orgánico seleccionado y se agita durante unos segundos para favorecer la extracción del metal en la fase orgánica. Cuando ambas fases se separan, se observa si se produce cambio de color en la fase orgánica, lo cual suele indicar la presencia de complejo metal-ligando coloreado neutro en dicha fase. La segunda etapa tiene por finalidad que se produzca la reextracción del metal mediante destrucción del complejo metálico al poner en contacto la fase orgánica con

otra ácida. La desaparición del color previamente observado en la fase orgánica, puede indicar la reextracción del complejo metálico.

No obstante, en este estudio se decidió realizar las pruebas de extracción-reextracción directamente mediante el empleo de la celda de membrana líquida de volumen, añadiendo los metales de interés (Ti(I), Pb(II), V(V), Ti(IV), Ag(I) y Cr(III)) en la disolución o fase cargada. Tras el proceso de preconcentración, se determinó la concentración de estos metales en la fase extraída o fase receptora ácida mediante espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy, ICP-AES).

A continuación se describe la composición de cada una de las fases constituyentes de este sistema de membrana líquida:

- Disolución o fase acuosa cargada (V_C). Se prepararon disoluciones de metal de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ en el caso de Ti(I) y Pb(II), y $50 \mu\text{g L}^{-1}$ para V(V), Ti(IV), Ag(I) y Cr(III). Con estas concentraciones el metal podría ser detectado con total facilidad si los porcentajes de recuperación fuesen del 50% o superiores. Para ello se tuvieron en cuenta los límites de detección de la técnica instrumental de medida (ICP-AES) para cada metal y el factor de preconcentración de la celda.

Así, se prepararon disoluciones de 300 mL que contenían 300 μL de las distintas disoluciones metálicas de 100 mg L^{-1} (Ti(I), Pb(II)) y 50 mg L^{-1} (V(V), Ti(IV), Ag(I), Cr(III)), preparadas a partir de la disolución patrón comercial de 1.000 mg L^{-1} de cada elemento. Además, para los estudios a pH ácido se ajustó el valor del pH con disoluciones diluidas de HNO_3 y NaOH (calidad Suprapur), hasta un pH aproximadamente de 4, mientras que para los estudios a pH básico, se añadieron 30 mL de disolución reguladora $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ de pH 9,5 y concentración 6 mol L^{-1} para controlar el valor del pH, enrasando finalmente con agua desionizada (Milli-Q). De esta disolución se tomaron 250 mL que fueron colocados en el vaso exterior de la celda de membrana líquida constituyendo la fase cargada, utilizándose los 50 mL restantes para evaluar el pH final de esta fase con un pH-metro.

- Disolución o fase acuosa receptora (V_R). Para estas pruebas se preparó una disolución receptora de carácter ácido con objeto de reextraer el complejo, conteniendo ácido nítrico (HNO_3) de concentración $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ y se depositaron 11 mL en el compartimento concéntrico interior de la celda de cuarzo, donde el metal se concentraría tras el proceso de transporte.

- Membrana líquida o fase orgánica (V_o). Constituida por 80 mL de disolución de la tiosemicarbazona 2-HBET en tolueno, de concentración $1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Esta fase, al tener una menor densidad, cubre a las disoluciones acuosas anteriores.

La cantidad de reactivo adicionada en la membrana se encontraba en exceso frente a las cantidades de metales añadidos en la fase cargada, con objeto de que el agente transportador no estuviera en defecto para poder realizar el adecuado transporte de los metales a través de la membrana líquida.

Los volúmenes descritos para las tres fases líquidas (fase cargada, fase receptora y membrana líquida) fueron seleccionados de forma que, evitando la mezcla de las fases acuosas, produjeran la máxima preconcentración del metal. Además, se prestó especial precaución al verter la fase orgánica sobre las acuosas, para evitar igualmente una posible mezcla. El control de la mezcla de fases durante el proceso de preconcentración fue realizado midiendo el valor de pH de la fase acuosa cargada al principio de cada experiencia y comprobándose que este valor se mantenía prácticamente invariable al finalizar el proceso de transporte. Este control es muy importante ya que el proceso de formación del complejo metálico está fuertemente determinado por el valor de pH.

Para facilitar el contacto entre las fases acuosas y la membrana líquida (fase orgánica), los experimentos se sometieron a agitación magnética durante todo el transcurso del proceso de separación/preconcentración del analito, mediante pequeños imanes de teflón (12 mm x 4 mm) presentes en ambas fases acuosas (ver Figuras II.B.1 y II.B.3). La velocidad máxima empleada se fijó en 700 r.p.m. (revoluciones por minuto), ya que en estudios previos se observó que valores superiores producían ruptura entre las barreras o interfases con la consiguiente mezcla entre fases. Por otro lado, valores inferiores a la velocidad establecida, daban lugar a una cinética muy lenta.

El tiempo empleado en los estudios previos de transporte metálico a través de la membrana líquida fue de 4 horas, extrayéndose posteriormente la fase receptora para ser analizada mediante espectroscopía de emisión atómica con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES). Estas medidas se realizaron por comparación mediante calibración lineal de los patrones de metal preparados en el mismo medio que se encontraba la fase receptora, es decir, una disolución de ácido nítrico $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ saturada en tolueno.

Para calcular qué porcentaje de metal había sido reextraído en la fase ácida receptora, se tuvo en cuenta la concentración máxima teórica esperada si el transporte se produjera con un rendimiento del 100%, siendo necesario emplear para estos cálculos el factor de preconcentración del sistema de membrana líquida utilizado. En este caso, teniendo en cuenta el volumen de la fase cargada de 250 mL, que contiene inicialmente las especies metálicas, y el volumen de la fase receptora de 11 mL, el factor de preconcentración del método de preconcentración fue de 22,73. Así, para el cálculo del porcentaje de preconcentración o eficacia del proceso de transporte, se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Preconcentración} = \frac{\text{Concentración medida}}{\text{Concentración teórica}} \cdot 100$$

Se estableció el límite de detección de cada metal en la fase receptora para la técnica de análisis empleada (ICP-AES), el cual se define matemáticamente como:

$$LD = 3\sigma_b / b$$

donde σ_b es la desviación estándar de la señal obtenida por el blanco utilizado en la calibración, y b la pendiente de la recta de calibración empleada para la determinación de la concentración de cada metal.

En la Tabla II.B.3 se muestran los valores de pH inicial y final de la fase acuosa cargada, la concentración hallada en la fase receptora después del proceso de transporte y el porcentaje de metal concentrado, para todos los metales estudiados a pH ácido. Se detalla el pH inicial y el final de la fase cargada con objeto de detectar posibles mezclas de fases y/o problemas de control del pH de la fase.

Para ninguno de los metales estudiados a pH 4 se observó eficacia en el proceso de transporte, excepto para el Tl(I), que experimentó un pequeño porcentaje de transporte. El resto de concentraciones obtenidas en la fase receptora, se encontraron por debajo del límite de detección. Además, hay que destacar que tanto los iones Ag(I) como los de Cr(III) no pudieron ser determinados en esta experiencia, porque en ambos casos se observó en el extracto ácido la presencia de un precipitado que impidió la medida mediante la técnica ICP-AES.

Tabla II.B.3. Eficacia del proceso de preconcentración a pH ácido para Tl(I), Pb(II), V(V), Ti(IV), Ag(I) y Cr(III) mediante el sistema de membrana líquida (V_C : [Metal]=50 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$; V_O : [2-HBET]= $1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; V_R : $[\text{HNO}_3]=0,3 \text{ mol L}^{-1}$; FPC=22,73; $t=4 \text{ h}$)

Metal	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	pH fase cargada		Concentración de metal en la fase receptora (mg L^{-1})	Límite de detección (mg L^{-1})	% Preconcentración
		pH inicial	pH final			
Tl(I)	100	4,0	4,2	0,316	0,030	14,0
Pb(II)	100	4,0	3,7	0,017	0,029	< LD
V(V)	50	4,0	4,2	0,015	0,027	< LD
Ti(IV)	50	4,0	4,0	0,006	0,035	< LD
Ag(I)	50	4,0	3,9	Aparición de precipitado	0,028	-
Cr(III)	50	4,0	4,1	Aparición de precipitado	0,018	-

De igual forma, se realizaron pruebas a valores de pH básico (9,5), cuyos resultados se muestran en la Tabla II.B.4. En este caso se obtuvo un rendimiento significativo para la preconcentración de Pb(II), de un 44%.

Tabla II.B.4. Eficacia del proceso de preconcentración a pH básico para Tl(I), Pb(II), V(V), Ti(IV), Ag(I) y Cr(III) mediante el sistema de membrana líquida (V_C : [Metal]=50 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$; V_O : [2-HBET]= $1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; V_R : $[\text{HNO}_3]=0,3 \text{ mol L}^{-1}$; FPC=22,73; $t=4 \text{ h}$)

Metal	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	pH fase cargada		Concentración de metal en la fase receptora (mg L^{-1})	Límite de detección (mg L^{-1})	% Preconcentración
		pH inicial	pH final			
Tl(I)	100	9,7	9,6	0,139	0,030	6,1
Pb(II)	100	9,7	9,6	0,998	0,029	44,0
V(V)	50	9,7	9,6	0,006	0,027	< LD
Ti(IV)	50	9,8	9,7	0,006	0,035	< LD
Ag(I)	50	9,6	9,5	-0,009	0,028	< LD
Cr(III)	50	9,7	9,7	0,003	0,018	< LD

En base a los resultados obtenidos, los estudios se enfocaron al desarrollo de un posible sistema de membrana líquida de volumen para la preconcentración de trazas de Pb(II), empleando como agente transportador la tiosemicarbazona 2-hidroxibenzaldehído-N-etiltiosemicarbazona (2-HBET) disuelta en tolueno y una fase cargada básica.

Como se expuso en la introducción de este capítulo, las tiosemicarbazonas son compuestos con altas propiedades quelatantes, es decir, pueden coordinar a diversos cationes metálicos a través de sus posibles posiciones de coordinación. En el caso de la 2-HBET, este compuesto puede coordinar al catión Pb(II) a través de los átomos de *N* (3 posiciones), *O* (1 posición) y *S* (1 posición), tal y como se muestra en la Figura II.B.4.

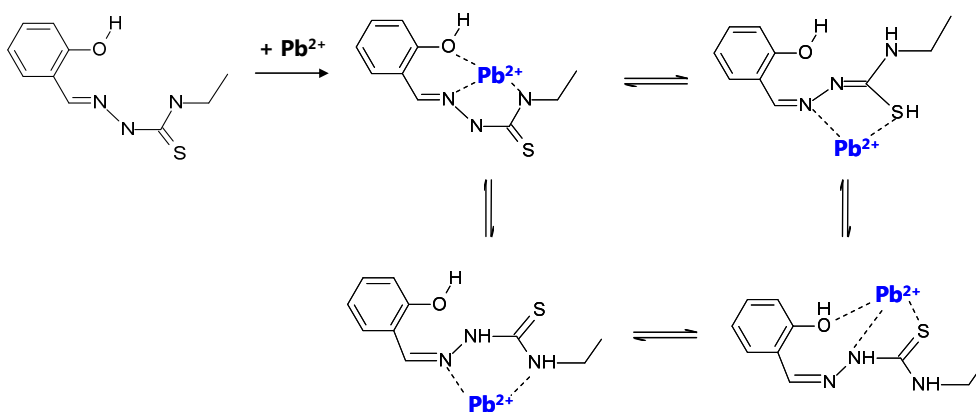


Figura II.B.4. Posibilidades de coordinación de la tiosemicarbazona 2-HBET con el ión Pb(II)

De manera general, el transporte de un ión metálico desde la fase acuosa cargada hacia la fase acuosa receptora a través de una membrana líquida de volumen, puede dividirse en los siguientes pasos o etapas [Koter y col., 2013]:

- 1) Etapa de difusión del ión a través de la capa límite de difusión existente entre la fase acuosa cargada y la cara externa de la membrana líquida.
- 2) Formación del complejo en la superficie de la membrana líquida entre el ión y el agente extractante disuelto en la fase orgánica.
- 3) Difusión del complejo metal-ligando a través de la capa límite de difusión existente en la parte interna de la membrana líquida.

- 4) Transporte por convección (mediante agitación magnética) hacia la zona donde se encuentra la fase acuosa receptora.
- 5) Difusión del complejo a través de la capa límite de difusión existente en la parte interna de la membrana líquida.
- 6) Ruptura del complejo o complejos metálicos al entrar en contacto con la superficie de la fase acuosa receptora.
- 7) Etapa de difusión a través de la capa límite de difusión entre la cara externa de la membrana líquida y la disolución acuosa receptora.

De esta forma, en estos experimentos previos el ión metálico Pb(II), inicialmente en la fase acuosa cargada, se puede preconcentrar al formar un complejo de coordinación con el reactivo 2-HBET. Así, es extraído de la fase cargada y posteriormente reextraído al ponerse en contacto con el medio ácido de la fase receptora, donde finalmente es separado y preconcentrado. Hay que indicar que, a diferencia de otros complejos metálicos con tiosemicarbazonas, durante estos estudios previos se observó que la formación del complejo entre el ión Pb(II) y el reactivo 2-HBET en la fase orgánica no produjo un complejo coloreado.

A continuación se describen la síntesis y los estudios de estabilidad del reactivo en la fase orgánica, para posteriormente desarrollar el estudio y optimización de las distintas variables que pueden afectar a la eficacia del proceso de preconcentración/separación mediante el empleo de la membrana líquida de volumen diseñada para la preconcentración de Pb(II) en medio acuoso, con el fin obtener el mayor rendimiento posible.

II.B.2.1. Síntesis de la tiosemicarbazona 2-hidroxibenzaldehído-N-etiltiosemicarbazona (2-HBET)

La tiosemicarbazona empleada como agente transportador fue sintetizada en el laboratorio (grupo de investigación "Geoquímica Marina" del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz). Además de este compuesto, se han sintetizado y estudiado otras hidrazonas, ya que la aplicación de éstas para la determinación de trazas metálicas en medio acuoso, es uno de los objetivos principales del campo de investigación del grupo.

La síntesis de la 2-hidroxibenzaldehído-N-etiltiosemicarbazona se basa en la reacción de condensación entre el compuesto *2-hidroxibenzaldehído* o *salicilaldehído* (2-HB) y la *4-etil-3-tiosemicarbazida* (ET). Para ello se mezclaron cantidades equimolares de ambos reactivos, es decir, 1 mL de 2-HB disuelto en 20 mL de etanol y 1,12 g de ET disuelto también en 20 mL de etanol. Esta síntesis (Figura II.B.5) se realizó

mediante calentamiento a reflujo de esta mezcla en un matraz de fondo redondo durante 10-15 minutos. Pasado este tiempo, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 24 horas. La precipitación del producto se favoreció rascando las paredes del matraz con una varilla de vidrio, obteniéndose un precipitado blanco. Después de su filtrado, con ayuda de una bomba de vacío, el sólido fue recrystalizado dos veces mediante calentamiento en una mezcla de agua/etanol (1:1 v/v) y posteriormente se dejó enfriar hasta filtrarse de nuevo. Finalmente, se secó en estufa a una temperatura de 60 °C aproximadamente. La síntesis del compuesto tuvo un rendimiento del 80%. Actualmente, la compañía Sigma-Aldrich también suministra este reactivo ya sintetizado, lo que facilita su uso (CAS Number: 76572-70-8) [<http://www.sigmaaldrich.com/>].

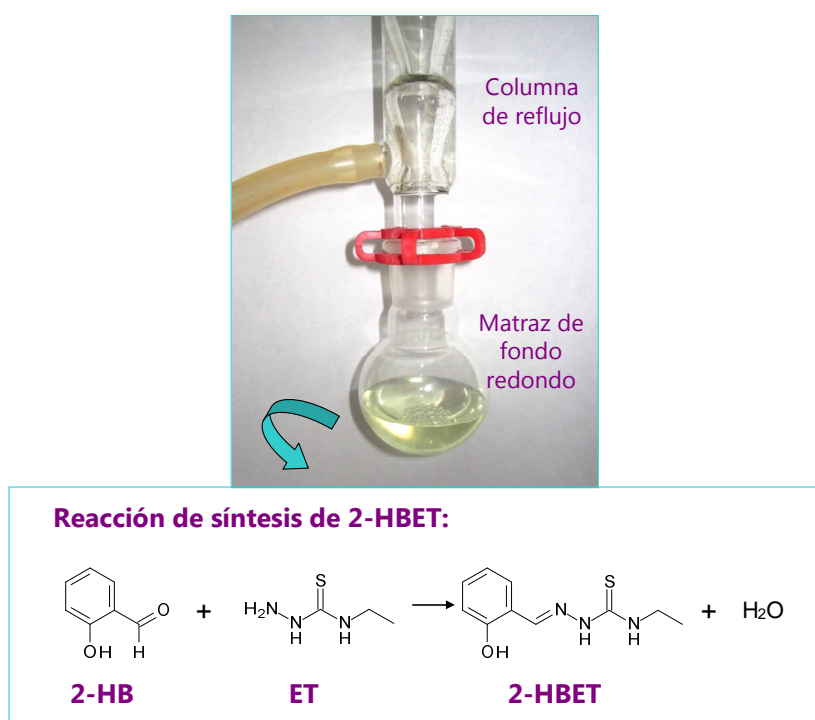


Figura II.B.5. Síntesis por condensación del reactivo 2-HBET (sistema con reflujo)
(2-HB: 2-hidroxibenzaldehído; **ET:** 4-etil-3-tiosemicarbazida; **2-HBET:** 2-hidroxibenzaldehído-N-etiltiosemicarbazona;
 fórmula molecular 2-HBET: C₁₀H₁₃N₃OS; peso molecular: 223,29 g mol⁻¹)

II.B.2.2. Estabilidad de la tiosemicarbazona 2-HBET en tolueno

Dado que los procesos de transporte en las membranas líquidas son procesos cinéticos que requieren de cierto tiempo, se procedió a estudiar la estabilidad del reactivo en tolueno. El objetivo era comprobar si durante el proceso de preconcentración el reactivo sufría algún tipo de modificación o degradación. Para ello, se registró previamente su espectro de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) con el fin de conocer la longitud de onda de absorción máxima del ligando, y estudiar espectroscópicamente su estabilidad.

Para la obtención del espectro UV-VIS del reactivo 2-HBET disuelto en tolueno, se preparó una disolución de reactivo de concentración $1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; siendo esta concentración del mismo orden que las concentraciones de las disoluciones que se prepararían posteriormente en los estudios con la membrana líquida de volumen. No obstante, el espectro de absorbancia de esta disolución producía valores de absorbancia muy elevados, por lo que se procedió a diluir esta primera disolución en tolueno (factor dilución 1:50 v/v) en el momento de la medida, disminuyendo así la intensidad de la señal. En la Figura II.B.6 se muestra el espectro de absorción del reactivo 2-HBET en tolueno para la concentración de la disolución diluida de $2,84 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, obteniéndose un máximo de absorción de este ligando a una longitud de onda de 338 nm.

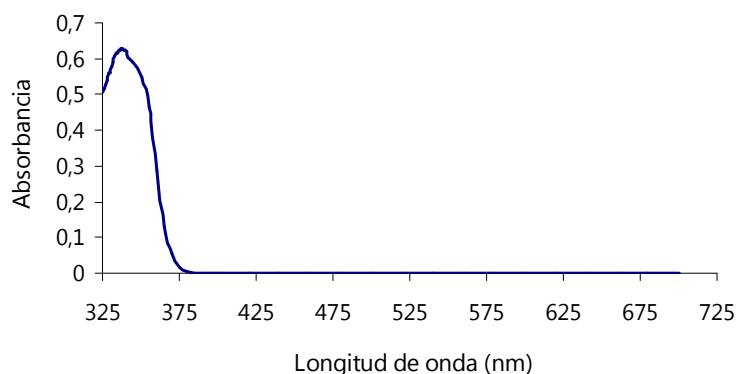


Figura II.B.6. Espectro de absorción UV-Vis del reactivo 2-HBET en tolueno ($[2\text{-HBET}] = 2,84 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)

Una vez conocido el valor de longitud de onda al cual se producía la máxima absorción del reactivo ($\lambda_{\text{max}}=338 \text{ nm}$) se determinó la estabilidad de la disolución midiendo la absorbancia a 338 nm en función del tiempo. Como se observa en la Figura II.B.7, durante las primeras cuatro horas las medidas de absorbancia fueron realizadas cada 15 minutos, y cada 30 minutos durante las cuatro horas siguientes. Las medidas se repitieron a las 24, 48 y 72 horas. Se concluyó que las disoluciones de 2-HBET en tolueno eran estables al menos durante 3 días, permitiendo su empleo en la celda de membrana líquida sin alterarse durante el proceso de transporte.

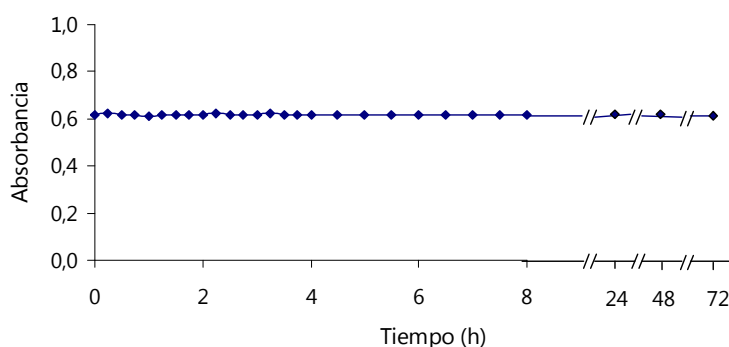


Figura II.B.7. Estudio de la estabilidad del ligando 2-HBET en tolueno ($[2 \text{ HBET}] = 2,84 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $\lambda_{\text{max}} = 338 \text{ nm}$).

II.B.3. Optimización del sistema de preconcentración de Pb(II) mediante la membrana líquida propuesta

Para poder establecer un método analítico, se requiere encontrar las condiciones químicas, instrumentales o de otra índole, más adecuadas para llevar a cabo los análisis mediante dicho método. Así, la finalidad de todo proceso de optimización es llegar a las condiciones que producen una mejor respuesta analítica [Montgomery, 2001]. Para ello pueden utilizarse métodos de optimización univariante o multivariante. En este trabajo se optó por el primer método debido a que las variables tenían un pequeño rango de variabilidad que permitían encontrar fácilmente el óptimo.

A continuación se describe el estudio y la selección de los valores óptimos de cada una de estas variables, de las que depende la eficacia del proceso de transporte a través de la membrana líquida de volumen. En estos estudios, la determinación de Pb(II) en la fase receptora fue determinada por espectroscopía de absorción atómica con llama (Flame Atomic Absorption Spectroscopy, FAAS).

II.B.3.1. Influencia de la naturaleza y el valor de pH de la disolución reguladora de la fase cargada sobre la eficacia del proceso de transporte

El pH es un parámetro importante que influye en la formación del complejo metal-ligando, que tiene lugar en la primera etapa del proceso en la interfase entre la fase cargada y la fase orgánica. Por este motivo, hay que trabajar con valores de pH apropiados para que este proceso se produzca adecuadamente.

Dado que en los estudios previos se observó que el transporte de Pb(II) estaba favorecido a pH básico (9,5), se seleccionaron diferentes disoluciones reguladoras de esta naturaleza y se estudiaron diversos valores de pH en el rango de valores próximos a la neutralidad y básicos, para los que se evaluó la eficacia del proceso de preconcentración con la membrana líquida propuesta. Así, se estudiaron distintos tipos de reguladoras y valores de pH, los cuales se muestran a continuación:

- Disolución reguladora $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ a valores de pH 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5 y 10.
- Disolución reguladora ácido (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano)sulfónico (HEPES) a pH 7 y 8.
- Disolución reguladora Britton-Robinson a pH 6, 7 y 8.

Previamente, se evaluó la concentración de disolución reguladora necesaria para realizar adecuadamente el control del pH de la fase cargada. Para ello, se preparó una disolución de igual concentración metálica que la empleada en las experiencias de membranas líquidas ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II)). Al contener ión plomo, la disolución era inicialmente ácida. A esta disolución se le fue añadiendo disolución reguladora hasta valor de pH constante, estableciéndose la concentración mínima necesaria para el control adecuado de este parámetro. En todo momento, y con objeto de diluir lo menos posible la muestra, se trataron de utilizar disoluciones muy concentradas de reguladora.

El estudio realizado para la disolución reguladora de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ se llevó a cabo, en primer lugar, mediante adiciones de una disolución de concentración 6 mol L^{-1} sobre un volumen de 20 mL de fase cargada ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II)). En la Figura II.B.8, se recogen los valores de pH obtenidos en la fase cargada tras sucesivas adiciones de volumen de disolución reguladora para cada pH seleccionado.

Como puede observarse en la gráfica, a partir de un volumen de 2,5 mL de disolución reguladora, es decir una concentración de $0,7 \text{ mol L}^{-1}$, se obtiene un valor de pH constante para cada valor de pH estudiado. De esta forma y para sucesivos estudios se seleccionó una concentración de disolución en la fase cargada algo superior para poder regular el pH de forma más robusta, utilizándose valores de concentración de $1,33 \text{ mol L}^{-1}$ en la fase cargada. Además, y para reducir el volumen de disolución reguladora a añadir, se incrementó la concentración de la disolución reguladora a 8 mol L^{-1} . De esta forma, la preparación de 300 mL de fase cargada requiere un volumen de disolución reguladora de 50 mL, que proporciona una concentración de $1,33 \text{ mol L}^{-1}$.

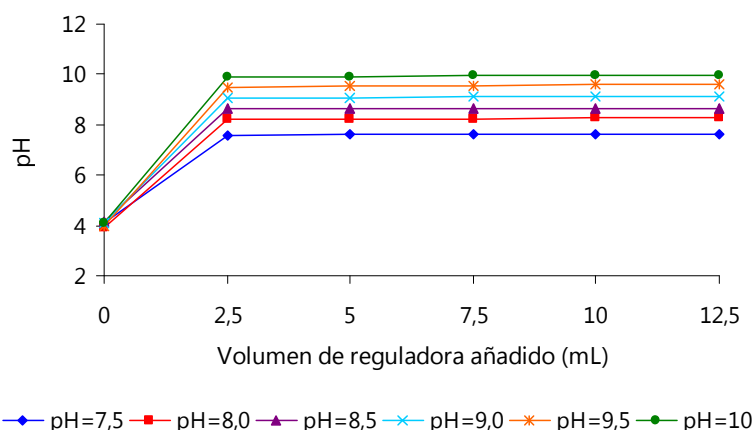


Figura II.B.8. Efecto de la concentración de la disolución reguladora $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ (6 mol L^{-1}) sobre el valor del pH de una disolución de Pb(II) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (volumen adicionado a 20 mL de disolución metálica). Estudio a varios valores de pH

De forma similar, se estableció la concentración óptima de disolución reguladora necesaria para controlar el pH de la fase cargada empleando disolución tampón HEPES y disolución universal Britton-Robinson. En el primer caso, la concentración necesaria de reguladora en la disolución de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II) de fase cargada de 300 mL fue de $0,17 \text{ mol L}^{-1}$ (obtenida por adición de 50 mL de disolución de HEPES 1 mol L^{-1}), y en el segundo caso fue suficiente la presencia de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (obtenida tras adicionar 50 mL de disolución de Britton-Robinson de fuerza iónica $1,5 \text{ mol L}^{-1}$).

Una vez determinada la cantidad de disolución reguladora a añadir, se procedió al estudio de la preconcentración/separación de pequeñas concentraciones de Pb(II) a través de la membrana líquida de volumen propuesta para estudiar la influencia de la naturaleza y valor de pH de la fase cargada sobre la eficacia del proceso. Las características y preparación de cada una de las fases fueron las siguientes:

- Fase acuosa cargada (V_C): se prepararon 300 mL de una disolución acuosa que contenía una concentración de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II), adicionando 50 mL de una disolución reguladora de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ 8 mol L^{-1} , HEPES (1 mol L^{-1}) o Britton-Robinson ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$). Como ya se comentó, los valores de pH de las disoluciones reguladoras empleadas fueron pH=7,5; 8; 8,5; 9; 9,5 y 10 para la disolución de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$; pH=7 y 8 para la disolución reguladora HEPES; y pH=6, 7 y 8 para la disolución reguladora Britton-Robinson. El volumen empleado de esta disolución en la membrana fue de 250 mL, empleándose los 50 mL restantes para la determinación del valor del pH inicial de la fase cargada.
- Membrana líquida o fase orgánica (V_O): 80 mL de una disolución de 2-HBET en tolueno de concentración $1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.
- Fase acuosa receptora (V_R): 11 mL de una disolución de HNO_3 de concentración $0,3 \text{ mol L}^{-1}$.

Los resultados que se obtuvieron para la eficacia del proceso de preconcentración realizado durante un tiempo de 4 horas con las diferentes disoluciones reguladoras se detallan en la Tabla II.B.5. En ella se indica el pH inicial y el final de la fase cargada con objeto de detectar posibles mezclas de fases y/o problemas de control del pH de la fase.

Tabla II.B.5. Influencia de la naturaleza y el pH de la disolución reguladora de la fase cargada sobre la eficacia del proceso de preconcentración (V_C : $[\text{Pb(II)}]=100 \mu\text{g L}^{-1}$; V_O : $[\text{2-HBET}]=1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; V_R : $[\text{HNO}_3]=0,3 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{FPC}=22,73$; $t=4 \text{ h}$)

Disolución reguladora	pH de la disolución reguladora	pH fase cargada		% Preconcentración
		pH inicial	pH final	
$\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ ($1,33 \text{ mol L}^{-1}$)	7,5	7,6	7,4	46,0
	8,0	8,1	8,0	85,0
	8,5	8,6	8,5	85,4
	9,0	9,0	8,9	72,0
	9,5	9,5	9,4	66,0
	10	10,0	10,0	53,0
HEPES ($0,17 \text{ mol L}^{-1}$)	7,0	6,9	6,9	13,4
	8,0	7,9	7,9	34,1
BRITTON-ROBINSON ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$)	6,0	6,0	6,0	2,9
	7,0	7,0	7,0	5,7
	8,0	8,0	8,0	4,4

Asimismo, estos resultados se han representado gráficamente en la Figura II.B.9 para una mejor visualización de los porcentajes de preconcentración obtenidos en cada caso. Se observó un máximo rendimiento para valores de pH que oscilaba entre 8 y 8,5 empleando la reguladora $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ como disolución de control de pH de la fase cargada. Por el contrario, la disolución reguladora de HEPES, cuya utilidad analítica se reduce a este intervalo de pH (7-8), no produjo buenos resultados. De igual forma, utilizando la disolución reguladora Britton-Robinson con valores cercanos a este intervalo tampoco se logró mejorar la eficacia del proceso de preconcentración. Por tanto, se decidió que la disolución reguladora de pH que debía emplearse en el sistema de membrana líquida fuera la de cloruro amónico/amoniaco, con unos valores de pH comprendidos entre 8 y 8,5 con una concentración final de $1,33 \text{ mol L}^{-1}$ en la disolución acuosa cargada, ya que favorecía la formación del complejo metal-ligando y permitía obtener mejores rendimientos en el proceso de preconcentración de trazas de plomo en muestras acuosas.

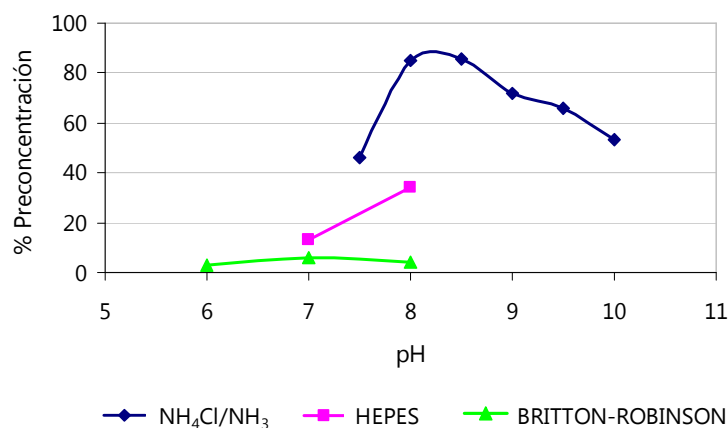


Figura II.B.9. Influencia de distintas disoluciones reguladoras y valores de pH en la fase cargada sobre el proceso de preconcentración (V_C : $[\text{Pb(II)}]=100 \mu\text{g L}^{-1}$; V_O : $[\text{2-HBET}]=1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; V_R : $[\text{HNO}_3]=0,3 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{FPC}=22,73$; $t=4 \text{ h}$)

II.B.3.2. Influencia de la concentración de reactivo en la membrana líquida sobre la eficacia del proceso de transporte

Una vez establecida la naturaleza de la disolución reguladora así como el valor óptimo de pH respecto a la fase cargada, se procedió al estudio de otra variable significativa en el proceso de transporte del ión metálico: la concentración de reactivo 2-HBET disuelto en la fase orgánica, cuyo conjunto constituye la membrana líquida del sistema.

Hasta ahora, se había considerado como concentración adecuada de agente transportador la presencia de un exceso considerable de ligando frente a las concentraciones usuales del ión metálico presente en la fase acuosa cargada, con objeto de desplazar la reacción de formación del complejo metálico. De esta manera, los estudios anteriores se habían realizado empleando 80 mL de una disolución de reactivo de $1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de concentración. Empleando esta cantidad de reactivo se disponían de $1,14 \cdot 10^{-4}$ moles de reactivo en la fase orgánica. A su vez, la concentración de metal en la fase cargada en estos estudios fue de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II), lo cual suponía una cantidad de $1,21 \cdot 10^{-7}$ moles de metal en los 250 mL de fase cargada. A partir de estos valores, se pudo calcular la relación molar Ligando:Metal para esas experiencias, la cual fue de 942 aproximadamente, lo que representa un exceso considerable de ligando en relación con la cantidad de metal a transportar. Este exceso, entre otros

factores, favoreció la reacción de formación del complejo metálico en la primera etapa de preconcentración.

No obstante, se consideró adecuado estudiar la influencia de la relación molar Ligando:Metal sobre la eficacia del transporte del ión metálico a través de la membrana líquida y conocer la aplicabilidad en muestras de diferente concentración de metal. Para ello, se realizaron diferentes experimentos en los que se mantuvo constante la cantidad de metal en la fase cargada ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II)) y se modificó la concentración del reactivo en la membrana líquida ($V_0=80 \text{ mL}$), estudiándose las siguientes relaciones molares Ligando:Metal 0, 471, 600, 942, 1884 y 4710. No se probaron concentraciones superiores de reactivo con objeto de evitar su posible precipitación en la membrana líquida y con ello, una disminución de la eficacia del sistema. El pH fue controlado en estas experiencias dentro del intervalo óptimo establecido anteriormente, entre 8 y 8,5, y las restantes condiciones no fueron modificadas.

En la Tabla II.B.6 se resumen los porcentajes de recuperación obtenidos. En el primero de los experimentos que aparecen en la tabla no se disolvió ninguna cantidad de reactivo transportador, es decir, la membrana líquida estuvo constituida únicamente por 80 mL de tolueno. Este estudio perseguía poder demostrar que el transporte de las trazas de plomo de la fase acuosa cargada era debido a la presencia del agente extractante 2-HBET, y no se transportaba por otro proceso. Así, la pequeña cantidad de plomo detectada en la fase ácida receptora pudo ser debida a posibles impurezas metálicas presentes en el tolueno o en la disolución de ácido nítrico empleada como fase receptora. Con objeto de minimizar este efecto, se deben de implementar técnicas de ultralimpieza a los reactivos y disoluciones empleados antes de su uso, y/o utilizar reactivos de un grado analítico superior, libres de impurezas metálicas.

Por tanto, mediante esta experiencia se puso de manifiesto el carácter de agente transportador de la tiosemicarbazona 2-hidroxibenzaldehído-N-etiltiosemicarbazona de las trazas de plomo presentes en la fase acuosa inicial, debido a la formación de compuestos de coordinación o quelatos neutros entre éste y el metal en la fase orgánica que constituye la membrana líquida.

Tabla II.B.6. Influencia de la concentración de 2-HBET en la membrana líquida sobre la eficacia del proceso de preconcentración (V_C : $[\text{Pb(II)}] = 100 \mu\text{g L}^{-1}$; $[\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3] = 1,33 \text{ mol L}^{-1}$; V_R : $[\text{HNO}_3] = 0,3 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{FPC} = 22,73$; $t = 4 \text{ h}$)

2-HBET (g)	Relación molar 2-HBET/Pb(II)	pH fase cargada		% Preconcentración
		pH inicial	pH final	
0	0	8,3	8,3	2,3
0,013	471	8,3	8,4	52,0
0,016	600	8,0	8,0	54,6
0,025	942	8,1	8,0	85,4
0,051	1884	8,5	8,5	85,1
0,127	4710	8,2	8,1	90,4

Todos estos resultados se han representado gráficamente en la Figura II.B.10, para una mejor visualización de los porcentajes de recuperación obtenidos en cada caso. En esta figura se puede observar que un aumento en la cantidad de reactivo en la membrana líquida producía un aumento en la eficacia del proceso de preconcentración. Con relaciones molares bajas, era probable que la cantidad de reactivo no fuera suficiente como para producir la extracción y separación cuantitativa de todo el metal de la fase acuosa cargada. Por el contrario, con relaciones molares mayores se veía favorecida la formación del complejo correspondiente. Sin embargo, se estableció como cantidad óptima de reactivo 2-HBET en la membrana líquida 0,025 g, ya que cuando se adicionó una cantidad 2 y 5 veces mayor (0,051 y 0,127 g) el rendimiento no aumentó de manera notable y se consideró un gasto innecesario de ligando al adicionar ese exceso.

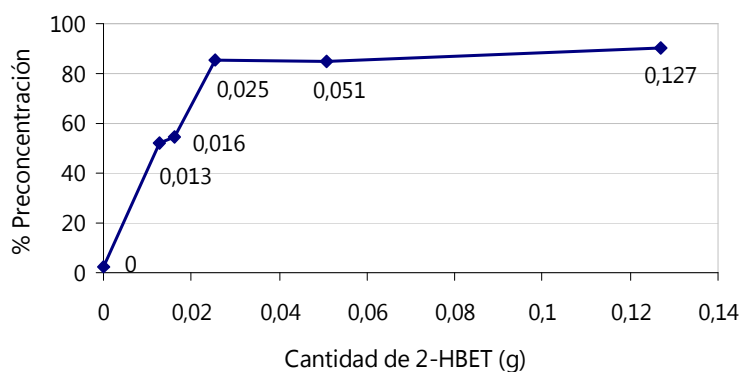


Figura II.B.10. Influencia de la cantidad de 2-HBET en la membrana líquida sobre el proceso de preconcentración (V_C : $[\text{Pb(II)}] = 100 \mu\text{g L}^{-1}$; $[\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3] = 1,33 \text{ mol L}^{-1}$; V_R : $[\text{HNO}_3] = 0,3 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{FPC} = 22,73$; $t = 4 \text{ h}$)

II.B.3.3. Influencia de la concentración de ácido nítrico de la fase receptora sobre la eficacia del proceso de transporte

El ácido nítrico en la fase receptora del sistema de membrana líquida estudiado actúa como donador de protones, rompiendo el complejo formado en la fase orgánica entre el metal y el agente transportador, según se explicó en la introducción de este capítulo. Para observar la influencia de este parámetro en la eficacia global del proceso de extracción/reextracción de los iones Pb(II), se realizaron diversas experiencias variando la concentración de ácido nítrico dentro del intervalo 0,1-1 mol L⁻¹. El resto de las condiciones se mantuvieron constantes tal y como se ha descrito previamente, empleando como membrana líquida 80 mL de una disolución de 2-HBET en tolueno, con una concentración de 1,42·10⁻³ mol L⁻¹, y realizando la preconcentración durante 4 horas.

En la Tabla II.B.7 y en la figura II.B.11 se muestran la eficacia del proceso de extracción/reextracción obtenida para cada una de las disoluciones de HNO₃ empleadas. Para ello, se utilizaron concentraciones de 0,1; 0,3; 0,5 y 1 mol L⁻¹ de HNO₃ como fase receptora.

Tabla II.B.7. Influencia de la concentración de HNO₃ en la fase receptora sobre la eficacia del proceso de preconcentración (V_C: [Pb(II)]=100 µg L⁻¹; [NH₄Cl/NH₃]=1,33 mol L⁻¹; V_O: [2-HBET]=1,42·10⁻³ mol L⁻¹; FPC=22,73; t=4 h)

[HNO ₃] en la fase cargada (mol L ⁻¹)	pH fase cargada		% Recuperación
	pH inicial	pH final	
0,1	8,5	8,4	84,0
0,3	8,5	8,5	85,1
0,5	8,5	8,5	70,0
1	8,6	8,5	67,0

A partir de estos resultados, se observó como la disolución de HNO₃ correspondiente a una concentración de 0,3 mol L⁻¹ ofrecía comparativamente una mayor eficacia en el proceso de transporte del catión Pb(II), favoreciendo la destrucción del complejo metálico Pb(II)-2-HBET previamente formado en la fase orgánica. Por tanto, se eligió la concentración de 0,3 mol L⁻¹ como la más favorable para la reextracción del metal en la fase receptora.

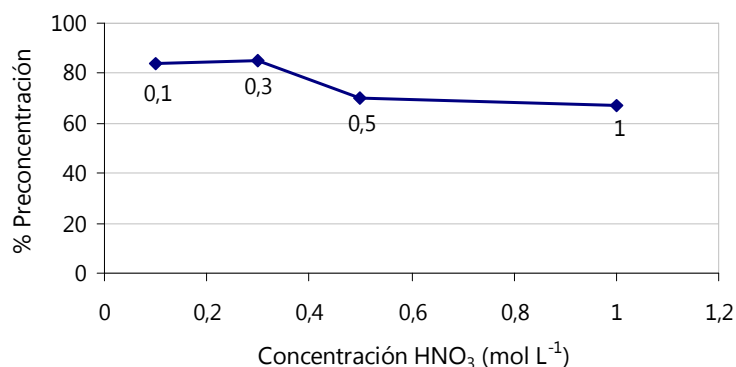


Figura II.B.11. Influencia de la concentración de HNO₃ en la fase receptora sobre el proceso de preconcentración (V_C : [Pb(II)]=100 $\mu\text{g L}^{-1}$; [NH₄Cl/NH₃]=1,33 mol L⁻¹; V_O : [2-HBET]=1,42·10⁻³ mol L⁻¹; FPC=22,73; t=4 h)

II.B.3.4. Influencia del tiempo de preconcentración sobre la eficacia del proceso de transporte

En los estudios anteriores la concentración de Pb(II) adicionada en la fase cargada fue 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se eligió esta concentración para que tras la preconcentración la cantidad de metal en la fase receptora fuese suficiente para su determinación mediante la técnica de espectroscopía de absorción atómica con llama no habiendo aún optimizado el método. Para estudios posteriores, se disminuyó este valor a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, estando mucho más próximo a la concentración real en las aguas naturales y no se utilizaron concentraciones menores, debido a que se trabajaba en las proximidades del límite de detección del equipo para este metal. En la Tabla II.B.8 se compara la eficacia del proceso de extracción para concentraciones de 100 y 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II) en la fase cargada. Para estos experimentos se emplearon las condiciones estudiadas hasta el momento: pH=8-8,5, [NH₄Cl/NH₃]=1,33 mol L⁻¹ en la fase cargada; [2-HBET]=1,42·10⁻³ mol L⁻¹ en la membrana líquida; [HNO₃]=0,3 mol L⁻¹ en la fase receptora.

Tabla II.B.8. Eficacia del proceso de preconcentración para dos concentraciones iniciales de Pb(II) en la fase cargada (V_C : $[Pb(II)] = 100$ y $25 \mu g L^{-1}$; $[NH_4Cl/NH_3] = 1,33 \text{ mol } L^{-1}$; V_O : $[2\text{-HBET}] = 1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$; V_R : $[HNO_3] = 0,3 \text{ mol } L^{-1}$; $FPC = 22,73$; $t = 4 \text{ h}$) ($n = 2$)

[Pb(II)] en la fase cargada ($\mu g L^{-1}$)	% Preconcentración
100	$80,9 \pm 1,3$
25	$69,9 \pm 0,9$

En base a estos resultados se observó que para concentraciones más bajas de plomo en la fase de alimentación (manteniéndose constante el resto de las condiciones) disminuía el rendimiento del proceso, probablemente debido a que el tiempo empleado hasta el momento para completar dicho proceso de transferencia no había sido aún optimizado. Por tanto, el siguiente parámetro a estudiar fue el tiempo necesario para obtener un transporte adecuado, estacionario y máximo, partiendo de concentraciones bajas de plomo de $25 \mu g L^{-1}$ en la fase cargada.

Para dichos estudios, las condiciones de las distintas fases fueron las que hasta el momento habían sido estudiadas y que pueden resumirse como:

- Fase acuosa cargada (V_C): 250 mL de una disolución de Pb(II) de $25 \mu g L^{-1}$ de concentración, regulada a pH 8,5 con NH_4Cl/NH_3 ($1,33 \text{ mol } L^{-1}$).
- Membrana líquida o fase orgánica (V_O): 80 mL de una disolución de 2-HBET en tolueno, de concentración $1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$.
- Fase acuosa receptora (V_R): 11 mL de una disolución de HNO_3 de concentración $0,3 \text{ mol } L^{-1}$.

Los tiempos estudiados fueron de 4, 5, 7, 9 y 11 horas, cuyos porcentajes de recuperación medios junto con sus desviaciones estándar pueden observarse en la Tabla II.B.9.

Tabla II.B.9. Influencia del tiempo de preconcentración sobre la eficacia del proceso (V_C : $[Pb(II)] = 25 \mu g L^{-1}$; $[NH_4Cl/NH_3] = 1,33 mol L^{-1}$; V_O : $[2-HBET] = 1,42 \cdot 10^{-3} mol L^{-1}$; V_R : $[HNO_3] = 0,3 mol L^{-1}$; $FPC = 22,73$) ($n=2$)

Tiempo de preconcentración (horas)	% Preconcentración
4	$69,9 \pm 0,9$
5	$71,3 \pm 0,1$
7	$83,5 \pm 0,6$
9	$82,3 \pm 3,9$
11	$83,3 \pm 1,9$

Como puede observarse en la Figura II.B.12, el porcentaje de recuperación del analito aumentó sensiblemente desde las 4 hasta las 7 horas, permaneciendo prácticamente constante a partir de este periodo de tiempo. De esta forma se llegó a un equilibrio a partir del cual el sistema no permitía transportar más cantidad de metal, aunque se aumentara el tiempo del experimento, obteniéndose un rendimiento del proceso bastante satisfactorio.

A partir de estos estudios, y para los siguientes experimentos, se emplearon 7 horas como tiempo adecuado para la preconcentración del metal.

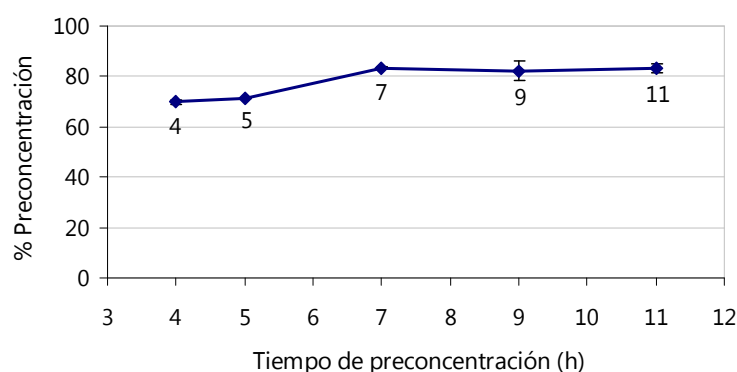


Figura II.B.12. Influencia del tiempo de preconcentración sobre la eficacia del proceso (V_C : $[Pb(II)] = 25 \mu g L^{-1}$; $[NH_4Cl/NH_3] = 1,33 mol L^{-1}$; V_O : $[2-HBET] = 1,42 \cdot 10^{-3} mol L^{-1}$; V_R : $[HNO_3] = 0,3 mol L^{-1}$; $FPC = 22,73$) ($n=2$)

II.B.3.5. Influencia de la temperatura en el proceso de transporte

La temperatura es un parámetro que puede ejercer influencia en la velocidad de este tipo de procesos de transporte. El proceso de difusión del metal desde la fase cargada hacia la fase orgánica es un proceso cinético que puede verse favorecido cuando se somete al sistema a un aumento de temperatura. Por otro lado, puede ejercer un efecto negativo causando la destrucción de algunos compuestos químicos del sistema, generalmente del reactivo orgánico empleado como agente transportador.

Por esta razón y con objeto de estudiar como afectaba la temperatura a la cinética del proceso, se realizó el estudio del sistema tanto a temperatura ambiente como se había venido trabajando, como a una temperatura significativamente mayor de 50 °C. La temperatura fue controlada colocando la celda de membrana líquida en un baño termostático.

Se estudiaron los rendimientos de extracción a esta nueva temperatura para diferentes tiempos de preconcentración, con las condiciones optimizadas hasta el momento: pH=8-8,5, $[\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3]=1,33 \text{ mol L}^{-1}$ en la fase cargada; $[\text{2-HBET}]=1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ en la membrana líquida; $[\text{HNO}_3]=0,3 \text{ mol L}^{-1}$ en la fase receptora.

En la Tabla II.B.10 se observan los resultados obtenidos a 50 °C para t= 3, 5, 6 y 7 horas. Además, se muestra la comparación con los resultados a temperatura ambiente para t= 5 y 7 horas.

Tabla II.B.10. Influencia de la temperatura y el tiempo de preconcentración sobre la eficacia del proceso (V_C : $[\text{Pb(II)}]=25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$; $[\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3]=1,33 \text{ mol L}^{-1}$; V_O : $[\text{2-HBET}]=1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; V_R : $[\text{HNO}_3]=0,3 \text{ mol L}^{-1}$; FPC=22,73) (n=2)

Tiempo de preconcentración (horas)	Temperatura (°C)	% Preconcentración
3	50	52,1 ± 1,2
5	Ambiente	71,3 ± 0,1
	50	74,6 ± 1,6
6	50	66,2 ± 1,3
7	Ambiente	83,5 ± 0,6
	50	60,4 ± 0,7

De los resultados anteriores pudo observarse que un aumento en la temperatura del sistema no favoreció el proceso de transporte del Pb(II) a través de la membrana líquida, siendo incluso similar la respuesta del sistema para un tiempo de preconcentración de 5 horas, e independiente de la temperatura, para los dos valores estudiados. Para tiempos de preconcentración mayores (6 y 7 horas) se observó incluso una disminución del porcentaje de recuperación del analito. Esto podría explicarse por la degradación del reactivo al estar bajo una temperatura de 50 °C. De esta manera, se optó por continuar aplicando un tiempo de 7 horas para la preconcentración del Pb(II) trabajando a temperatura ambiente.

II.B.4. Influencia del ión cloruro y de la salinidad de la muestra en el proceso de transporte de Pb(II)

Con objeto de no diluir la muestra en exceso durante la aplicación de la membrana desarrollada a muestras reales se decidió, en los experimentos sucesivos, reducir el volumen de disolución reguladora adicionado a los 300 mL utilizados al preparar la fase cargada. En estudios anteriores se había comprobado que a partir de una concentración de disolución reguladora de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ $0,7 \text{ mol L}^{-1}$, el valor del pH de la disolución se mantiene constante. Por ello, se decidió que una concentración de $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ podía seguir siendo adecuada y requería menor adición de disolución reguladora en la fase cargada para regular el valor del pH. Para ello, y partiendo de la disolución reguladora concentrada de 8 mol L^{-1} , el volumen a adicionar a los 300 mL era de 30 mL en lugar de los 50 mL empleados en los estudios previos. De esta forma, las condiciones de las distintas fases quedaron como:

- Fase acuosa cargada (V_O): se preparó una disolución acuosa de 300 mL, que contenía una concentración de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II) y 30 mL de una disolución reguladora de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ 8 mol L^{-1} de valor de pH 8-8,5. De esta disolución se emplearon 250 mL en la membrana líquida y los 50 mL restantes se utilizaron para medir el valor del pH inicial de la fase cargada. Cada experiencia se realizó por duplicado.
- Membrana líquida o fase orgánica (V_O): 80 mL de una disolución de 2-HBET en tolueno de concentración $1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.
- Fase acuosa receptora (V_R): 11 mL de una disolución de HNO_3 de concentración $0,3 \text{ mol L}^{-1}$.

Las condiciones restantes establecidas fueron:

- Tiempo de preconcentración: 7 h
- Temperatura: temperatura ambiente
- Velocidad de agitación del sistema: 700 r.p.m.

Se realizaron algunos experimentos bajo estas condiciones y se observó una disminución del rendimiento, desde un 83% a un 70% aproximadamente (Tabla II.B.11) sin que la disminución de disolución reguladora tuviera como consecuencia la falta de control del pH de la fase cargada.

Tabla II.B.11. Influencia del volumen adicionado de disolución reguladora en la fase cargada sobre la eficacia del proceso de preconcentración (V_C : $[Pb(II)] = 25 \mu g L^{-1}$; V_O : $[2-HBET] = 1,42 \cdot 10^{-3} mol L^{-1}$; V_R : $[HNO_3] = 0,3 mol L^{-1}$; $FPC = 22,73$; $t = 7 h$) ($n = 2$)

Volumen de disolución reguladora (mL)	$[NH_4Cl/NH_3]$ en la fase cargada ($mol L^{-1}$)	pH fase cargada		% Preconcentración
		pH inicial	pH final	
30	0,8	8,5	8,4	$70,5 \pm 1,5$
		8,5	8,5	
50	1,33	8,5	8,4	$83,5 \pm 0,6$
		8,4	8,3	

Por tanto, el efecto de la disolución reguladora sobre el proceso debía de ser doble. La disolución reguladora empleada, NH_4Cl/NH_3 , no sólo ejercía un papel fundamental en la regulación del pH de la fase cargada, sino que participaba de un modo activo en el proceso de transporte. Parecía por tanto que el proceso de transporte no hubiese tenido lugar mediante un mecanismo de contratransporte acoplado, como se había propuesto hasta el momento. En este caso, podría haberse producido un proceso de cotransporte acoplado, de forma que tanto el Pb^{2+} como el ión Cl^- , difundieran hacia la interfase orgánica para formar un complejo neutro con el 2-HBET allí disuelto. En la Figura II.B.13 se muestra el mecanismo de transporte del analito propuesto a raíz de los resultados obtenidos.

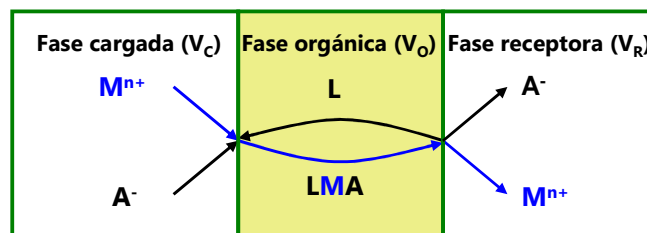


Figura II.B.13. Mecanismo de cotransporte propuesto (el ión Cl^{-} participa en el proceso de cotransporte; L =agente transportador; $\text{M}^{n+}=\text{Pb}^{2+}$; $\text{A}^{-}=\text{Cl}^{-}$)

De esta forma, el ión cloruro se encontraría implicado en dicho proceso. En este caso, los protones no intervendrían en el proceso de transporte directamente como consecuencia del gradiente de protones del sistema, aunque sí que influyen en la formación del complejo en la interfase orgánica, pues la carga del ligando está afectada por el pH de la disolución. Igualmente, la destrucción del complejo en la fase receptora se producirá por el exceso de acidez presente, permitiendo el transporte del ión metálico hacia dicha fase.

Dado que el objetivo de este trabajo era aplicar el método a muestras de aguas naturales de salinidad diversa (incluso de elevada salinidad, como el agua de mar), se optó por ampliar estos experimentos evaluando la influencia de la salinidad de la muestra sobre la eficacia del proceso de transporte. De esta forma, la presencia de iones cloruro que aporta la salinidad podía tener el mismo efecto que el exceso de concentración de disolución reguladora de cloruro amónico/amoniaco.

Para ello se prepararon disoluciones de Pb(II) con diferentes concentraciones salinas de cloruro sódico (NaCl) (0, 10, 20, 30 y 40 g L^{-1}). Las restantes condiciones de la membrana fueron las descritas en los experimentos anteriores ($[\text{2-HBET}]=1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ en la membrana líquida; $[\text{HNO}_3]=0,3 \text{ mol L}^{-1}$ en la fase receptora) y empleando una concentración de disolución reguladora de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ 0,8 mol L^{-1} de pH 8-8,5 (30 mL).

En la Tabla II.B.12 se describen los experimentos realizados durante un tiempo de preconcentración de 7 horas, y cuyos resultados pueden observarse gráficamente en la Figura II.B.14.

Tabla II.B.12. Influencia de la salinidad en la muestra sobre la eficacia del proceso de preconcentración (V_C : $[Pb(II)] = 25 \mu g L^{-1}$; $[NH_4Cl/NH_3] = 0,8 mol L^{-1}$; V_O : $[2-HBET] = 1,42 \cdot 10^{-3} mol L^{-1}$; V_R : $[HNO_3] = 0,3 mol L^{-1}$; $FPC = 22,73$; $t = 7 h$) ($n = 2$)

[NaCl] en la muestra (g L ⁻¹)	pH fase cargada		% Preconcentración
	pH inicial	pH final	
0	8,5	8,4	70,5 ± 1,5
	8,5	8,5	
10	8,6	8,6	83,7 ± 1,9
	8,6	8,6	
20	8,5	8,5	84,7 ± 0,4
	8,4	8,4	
30	8,4	8,5	82,2 ± 0,5
	8,4	8,4	
40	8,6	8,6	82,3 ± 0,7
	8,4	8,4	

En base a los resultados, se observó cómo el aumento de la salinidad incrementó la eficacia, debido -como se propuso- a que el ión cloruro presente en la disolución interviene en el proceso de transporte, siendo suficiente la presencia de 10 g L⁻¹ de NaCl en la muestra para conseguir la misma eficacia en el proceso que la obtenida en experimentos anteriores, donde la concentración de la disolución reguladora era mayor (1,33 mol L⁻¹). Además, incrementos en la salinidad de la muestra no modifican el valor de la eficacia, por lo que el sistema alcanzó con esa salinidad su máxima capacidad de transporte.

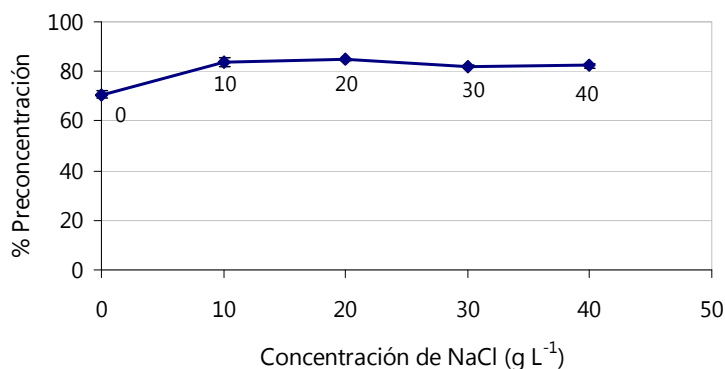


Figura II.B.14. Influencia de la salinidad de la muestra sobre la eficacia del proceso de preconcentración (V_C : $[Pb(II)] = 25 \mu g L^{-1}$; $[NH_4Cl/NH_3] = 0,8 mol L^{-1}$; V_O : $[2-HBET] = 1,42 \cdot 10^{-3} mol L^{-1}$; V_R : $[HNO_3] = 0,3 mol L^{-1}$; $FPC = 22,73$; $t = 7 h$)

Como consecuencia de estos resultados, se pudo concluir que el porcentaje de recuperación del analito fue óptimo en las muestras que contenían NaCl, y que se puede reducir la cantidad de disolución reguladora siempre que la presencia de iones cloruro ($\geq 10 \text{ g L}^{-1}$ de NaCl) sea suficiente para producir cotransporte del complejo a través de la membrana líquida. El sistema propuesto es, pues, aplicable a muestras de agua de mar, lo cual lo convierte en un método de interés por la propia complejidad que presenta la matriz salina a la hora de analizar este tipo de muestras mediante métodos directos.

Además de estos estudios, y con el fin de asegurar que la concentración inicial de plomo adicionada en la fase acuosa cargada se mantenía estable con el tiempo y no precipitaba ni reaccionaba a lo largo de las 7 horas del experimento, lo que podría explicar la no obtención del 100% de eficacia, se procedió a realizar una determinación electroanalítica de esta disolución en función del tiempo, en ausencia y presencia de cloruro sódico.

Las disoluciones constituyentes de ambas fases acuosas cargadas o de alimentación fueron preparadas de la forma habitual:

- *Disolución de la fase cargada sin NaCl*: 250 mL de una disolución de Pb(II) de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de concentración, regulada a pH 8,5 con $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ ($0,8 \text{ mol L}^{-1}$).
- *Disolución de la fase cargada con NaCl*: 250 mL de una disolución de Pb(II) de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de concentración, regulada a pH 8,5 con $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ ($0,8 \text{ mol L}^{-1}$) y con una concentración salina (NaCl) de 30 g L^{-1} .

Para estas determinaciones de la concentración de Pb(II) en la fase cargada en función del tiempo se empleó la técnica de voltamperometría de redisolución anódica de pulso diferencial (Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry, DPASV). Mediante esta técnica se analizó electroquímicamente la concentración de Pb(II) existente en las disoluciones (salina y no salina) realizándose tomas de muestra a intervalos de una hora. Esta técnica está ampliamente extendida para la determinación de plomo en muestras acuosas, siendo los valores fijados para cada parámetro los siguientes (Tabla II.B.13):

Tabla II.B.13. Parámetros electroquímicos establecidos para la determinación de Pb(II) mediante la técnica DPASV

Parámetros electroquímicos establecidos para la medida por DPASV de Pb(II)	
Electrodo de trabajo	HMDE
Tamaño de gota de mercurio	4
Potencial de deposición (E_d)	-1,15 V
Tiempo de deposición (t_d)	120 s
Amplitud de pulso (U_{ampl})	0,05 V
Salto de potencial (U_{step})	0,006 V
Intervalo de tiempo para el salto de potencial (t_{step})	0,1 s
Velocidad de barrido	0,06 V/s
Potencial inicial de barrido	-1,0 V
Potencial final de barrido	0 V
Pico de potencial para la medida de Pb(II)	-0,38 V

Para realizar las determinaciones se tomaron alícuotas de 2 mL de muestra, cuyo volumen se llevó hasta 10 mL en la celda de medida del equipo mediante la adición de agua Milli-Q (dilución 1:5). Finalmente, se adicionó 1 mL de disolución reguladora ácido acético/acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$) 3 mol L^{-1} para acondicionar la disolución desde un pH de 8,5 hasta un pH de 4,7 necesario para esta determinación por DPASV. También se realizó, en cada caso, la medida de un blanco (muestra sin metal) cuyo valor se tuvo en cuenta a la hora de determinar la concentración final de plomo en la muestra. En la Tabla II.B.14 se muestran los resultados obtenidos tras estas medidas, donde puede observarse cómo la concentración de Pb(II) disuelto permaneció prácticamente constante en ambas disoluciones a lo largo del periodo de tiempo estudiado. Ello implica que el plomo disuelto estaba disponible para ser transportado desde la fase cargada.

Tabla II.B.14. Estabilidad de la concentración de Pb(II) disuelto en la fase cargada con y sin adición de 30 g L⁻¹ de NaCl medido por DPASV ([Pb(II)]=25 µg L⁻¹; [NH₄Cl/NH₃]=0,8 mol L⁻¹)

Tiempo transcurrido desde la preparación de la fase cargada (horas)	[Pb(II)] (µg L ⁻¹) en la fase cargada sin NaCl	[Pb(II)] (µg L ⁻¹) en la fase cargada con 30 g L ⁻¹ de NaCl
0	24,6 ± 0,9	26,5 ± 1,6
1	26,4 ± 0,9	25,2 ± 1,1
2	29,1 ± 1,6	24,6 ± 0,9
3	24,6 ± 1,4	27,2 ± 1,5
4	25,0 ± 1,1	25,6 ± 1,2
5	23,2 ± 2,3	26,6 ± 1,8
6	24,3 ± 2,3	28,3 ± 2,1
7	29,1 ± 1,4	25,3 ± 0,9

II.B.5. Procedimiento propuesto para la preconcentración del plomo en medio acuoso mediante la membrana líquida conteniendo 2-HBET

A partir de los resultados obtenidos, se propone el siguiente procedimiento para llevar a cabo la preconcentración de trazas de plomo mediante el empleo de la celda de membrana líquida que contiene 2-HBET:

Se toma un volumen exacto de 270 mL de muestra problema, la cual debe contener una concentración final de NaCl de al menos 10 g L⁻¹, ya sea por adición o porque lo contenga la propia matriz de la muestra. Este volumen se enrasa hasta 300 mL con disolución reguladora NH₄Cl/NH₃ (8 mol L⁻¹) de pH 8-8,5. De esta disolución se toman 250 mL que se depositan en el compartimento exterior de la celda empleada en estos estudios, constituyendo la fase cargada (V_O). En el compartimento interior de la celda se depositan 11 mL de una disolución de HNO₃ 0,3 mol L⁻¹ (V_R). Por último, se adicionan 80 mL de una disolución de 2-HBET 1,42·10⁻³ mol L⁻¹ en tolueno sobre ambas fases acuosas constituyendo la membrana líquida (V_Ø).

En los compartimentos exterior e interior se colocan unos pequeños imanes que permiten la agitación de las fases acuosas mediante el uso de un agitador magnético a una velocidad de 700 r.p.m. Todo el sistema permanece en agitación continua durante 7 horas a temperatura ambiente.

La parte superior de la celda debe cubrirse con una tapa con el fin de evitar posibles contaminaciones o la evaporación accidental del disolvente orgánico.

Se debe tener en cuenta la dilución ocasionada al añadir los 30 mL de disolución reguladora sobre los 270 mL de muestra, en el momento de realizar los cálculos. Así, la celda de membrana líquida diseñada tiene un factor de preconcentración de 22,73, siendo por tanto la preconcentración del analito desde la muestra inicial hasta la fase cargada de **20,45** veces (denominado factor de preconcentración del método, FPM).

II.B.6. Características analíticas del método de preconcentración mediante la membrana líquida diseñada conteniendo 2-HBET

En este apartado se describen los estudios realizados para la caracterización del método de membrana líquida propuesto, tales como repetibilidad, límite de detección y de cuantificación (sensibilidad del método) y rango de aplicación del método.

II.B.6.1. Repetibilidad del método de preconcentración

La repetibilidad del método de preconcentración se evaluó mediante una serie de repeticiones de un mismo experimento, utilizando las condiciones experimentales definidas como óptimas. La preparación y composición de cada una de las fases fue:

- Fase acuosa cargada (V_C): Se partió de 270 mL de una muestra salina (30 g L^{-1}) conteniendo $25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II), a la cual se añadieron 30 mL de disolución reguladora $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ ($0,8 \text{ mol L}^{-1}$) a pH 8-8,5. Finalmente se tomaron 250 mL como fase cargada de la membrana líquida.
- Membrana líquida o fase orgánica (V_O): 80 mL de una disolución de 2-HBET en tolueno de concentración $1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.
- Fase acuosa receptora (V_R): 11 mL de una disolución de HNO_3 de concentración $0,3 \text{ mol L}^{-1}$.

La precisión se define como la dispersión de los valores obtenidos alrededor del valor medio, o bien como la proximidad o concordancia entre los resultados obtenidos por aplicación del mismo procedimiento experimental (metodología) varias veces bajo condiciones descritas. La precisión depende exclusivamente de la distribución de

errores aleatorios y no del valor verdadero. Esta propiedad junto con la exactitud constituyen dos parámetros importantes que definen la calidad de un método de análisis. Si el procedimiento se efectúa siempre en idénticas condiciones, este grado de concordancia se conoce como *repetibilidad*. En cambio, si alguna/s de las condiciones (como observador, instrumento de medición, lugar, periodo de tiempo, entre otras) se modifican, se habla de *reproducibilidad* [Cámara y col., 2004].

Para estos estudios se realizaron 6 réplicas bajo las condiciones previamente descritas. El porcentaje de error o precisión del método se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Precisión(\%)} = \frac{s \cdot t}{\bar{x} \cdot (\sqrt{n})};$$

donde el valor del parámetro *t-Student* para un número de 6 experimentos (grados de libertad=5) es de 2,571, aceptando un intervalo de confianza del 95%.

En la Tabla II.B.15 se muestran los valores obtenidos para el porcentaje de preconcentración o eficacia del proceso y otros parámetros de interés empleados para el cálculo de la precisión. El valor de la precisión así obtenida fue de 3,07%, confirmando las adecuadas condiciones del sistema propuesto.

Tabla II.B.15. Repetibilidad del método de membrana líquida de volumen propuesto para la preconcentración de trazas de Pb(II) (V_C : [Pb(II)]=25 $\mu\text{g L}^{-1}$; $[\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3]$ =0,8 mol L^{-1} ; $[\text{NaCl}]$ =30 g L^{-1} ; V_O : [2-HBET]=1,42·10⁻³ mol L^{-1} ; V_R : $[\text{HNO}_3]$ =0,3 mol L^{-1} ; FPM=20,45; t=7 h) (n=6)

Parámetros	Valores
% Preconcentración	87,93; 84,12; 84,54; 82,08; 82,05; 81,29
Media (\bar{x})	83,67
Desviación estándar (s)	2,45
Desviación estándar relativa $RSD(\%) = s / \bar{x} \cdot 100$	2,93
Intervalo de confianza	95%
Número de experimentos (n)	6
Grados de libertad (n-1)	5
Valor <i>t-Student</i>	2,571
Precisión (%)	3,07

El valor promedio de la eficacia de la preconcentración obtenido en este apartado (**83,7% \pm 2,5**) será utilizado como referencia del método propuesto.

II.B.6.2. Sensibilidad del método: Límites de detección y cuantificación

Para el sistema de membrana líquida de volumen empleado en este trabajo de investigación, el límite de detección (o ruido químico, o límite de preconcentración) se definió como la cantidad mínima de plomo que se puede preconcentrar durante el proceso de transporte a través de la membrana líquida. Este parámetro es muy importante para cualquier método analítico, y para su cuantificación se aplicó el criterio de la desviación del blanco del método.

Para la determinación de estos límites, se realizaron 6 blancos en donde la fase acuosa cargada se preparó de la siguiente forma:

- *Fase acuosa cargada (V_C)*: Se tomaron 270 mL de agua desionizada Milli-Q (sin metal) con una concentración de 30 g L⁻¹ de NaCl, a la que se añadieron 30 mL de disolución reguladora a pH 8,5 con NH₄Cl/NH₃ (0,8 mol L⁻¹). Posteriormente, se depositaron 250 mL en el compartimento exterior de la celda de membrana.

Se aplicó el método propuesto y las fases receptoras fueron analizadas mediante espectroscopía de absorción atómica por horno de grafito (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy, GFAAS). Se empleó esta técnica debido a que se esperaba encontrar bajos niveles de plomo en la fase ácida receptora de los blancos, siendo el límite de detección de la misma de 0,545 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II), obtenido a partir de la desviación estándar de 10 réplicas del blanco de esta fase receptora, y preparados con ácido nítrico 0,3 mol L⁻¹ saturado en tolueno y de la pendiente de la recta de calibración.

En la Tabla II.B.16 se muestran los resultados de la determinación de la concentración de plomo de estas muestras blanco, teniendo en cuenta la eficacia media del rendimiento, el factor de dilución que incluye el procedimiento diseñado para el análisis de las muestras y el factor de preconcentración de la celda. Así, se ha incluido el valor de la concentración de metal en la fase receptora y luego se ha calculado el valor del blanco al aplicar el método a la muestra. El valor medio del blanco del método de preconcentración (0,757 \pm 0,130 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II)) fue tenido en cuenta en las medidas de las muestras en posteriores análisis.

A partir de estos datos, se calculó el límite de detección (L.D.) del sistema de preconcentración desarrollado, definido como la concentración de analito que daba una respuesta equivalente a tres veces la desviación estándar del blanco [IUPAC, 1997]. El valor de ese límite de detección se estimó en $0,391 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II) en la fase cargada. De forma similar se determinó el límite de cuantificación (L.C.), definido como la concentración de analito que daba una respuesta equivalente a diez veces la desviación estándar del blanco [IUPAC, 1997], obteniéndose en este caso un valor de $1,305 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II) en la muestra (Tabla II.B.16).

Tabla II.B.16. Concentración de plomo en las muestras del blanco del método de preconcentración mediante membrana líquida propuesto (V_C : $[\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3]=0,8 \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NaCl}]=30 \text{ g L}^{-1}$; V_O : $[\text{2-HBET}]=1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; V_R : $[\text{HNO}_3]=0,3 \text{ mol L}^{-1}$; FPM=20,45; $t=7 \text{ h}$)

Réplicas de las muestras blanco	[Pb(II)] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	En la fase receptora	Muestra blanco ⁽¹⁾
1	14,36	0,839
2	11,59	0,677
3	10,18	0,595
4	11,95	0,698
5	13,16	0,769
6	16,47	0,962
\bar{x}_{blanco}	12,95	0,757
σ_{blanco}	2,23	0,130
LD		0,391
LQ		1,305

⁽¹⁾ $C_{\text{blanco}} = ([\text{Pb(II)}]_{\text{fase receptora}} / 20,45) \times 100/83,7$

II.B.6.3. Intervalo de linealidad del método de preconcentración de Pb(II) mediante la membrana líquida propuesta

Para conocer el rango de linealidad y, por tanto, evaluar la aplicabilidad del método propuesto, se prepararon y analizaron muestras con distintas concentraciones de plomo en el rango de $5\text{-}300 \mu\text{g L}^{-1}$. La técnica de medida de la fase receptora fue seleccionada en función de la concentración del metal en la misma. Así, para concentraciones superiores a los $20 \mu\text{g L}^{-1}$ en la muestra, se empleó -así como en los estudios de optimización- la espectroscopía de absorción atómica con atomización con

llama (Flame Atomic Absorption Spectroscopy, FAAS). Para concentraciones inferiores a los $20 \mu\text{g L}^{-1}$ se emplearon la espectroscopía de absorción atómica con atomización con horno de grafito (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy, GFAAS) y la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS).

En la Tabla II.B.17 se recogen los resultados obtenidos. Cabe destacar que el método presenta una buena linealidad en el rango $20\text{--}300 \mu\text{g L}^{-1}$ usando la espectroscopía atómica con atomización con llama (FAAS), que es la técnica más sencilla y menos costosa. Además, es posible determinar concentraciones en el rango $5\text{--}20 \mu\text{g L}^{-1}$, empleando la atomización con horno de grafito (GFAAS) (Figura II.B.15; en la figura se muestra ampliada la zona correspondiente a concentraciones $\leq 20 \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabla II.B.17. Intervalo de linealidad del método de preconcentración de Pb(II) mediante la membrana líquida propuesta (eficacia del proceso: $83,7 \pm 2,5\%$) (V_C : $[\text{Pb(II)}]=5\text{--}300 \mu\text{g L}^{-1}$; $[\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3]=0,8 \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NaCl}]=30 \text{ g L}^{-1}$; V_O : $[2\text{-HBET}]=1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; V_R : $[\text{HNO}_3]=0,3 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{FPM}=20,45$; $t=7 \text{ h}$) ($n=2$)

[Pb(II)] adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Técnica empleada	[Pb(II)] en la fase receptora ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Pb(II)] en la muestra ($\mu\text{g L}^{-1}$)
5	GFAAS	$102,59 \pm 0,62$	$5,99 \pm 1,05$
	ICP-MS	$101,55 \pm 5,84$	$5,93 \pm 2,54$
10	GFAAS	$192,23 \pm 5,73$	$11,23 \pm 3,28$
	ICP-MS	$179,83 \pm 5,02$	$10,50 \pm 2,97$
15	GFAAS	$309,74 \pm 5,96$	$18,09 \pm 4,34$
	ICP-MS	$256,93 \pm 11,60$	$15,01 \pm 5,50$
20	GFAAS	$445,15 \pm 6,93$	$26,00 \pm 5,78$
	ICP-MS	$336,35 \pm 5,23$	$19,65 \pm 4,36$
	FAAS	$361,82 \pm 5,28$	$21,13 \pm 4,59$
25	FAAS	$430,87 \pm 1,51$	$25,17 \pm 4,11$
50	FAAS	$767,02 \pm 6,58$	$44,80 \pm 8,42$
100	FAAS	$1.640,38 \pm 5,13$	$95,81 \pm 15,86$
150	FAAS	$2.614,80 \pm 36,13$	$152,73 \pm 32,63$
300	FAAS	$5.275,05 \pm 22,20$	$308,11 \pm 51,34$

GFAAS: Espectroscopía de absorción atómica con atomización con horno de grafito

ICP-MS: Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo

FAAS: Espectroscopía de absorción atómica de horno con atomización con llama

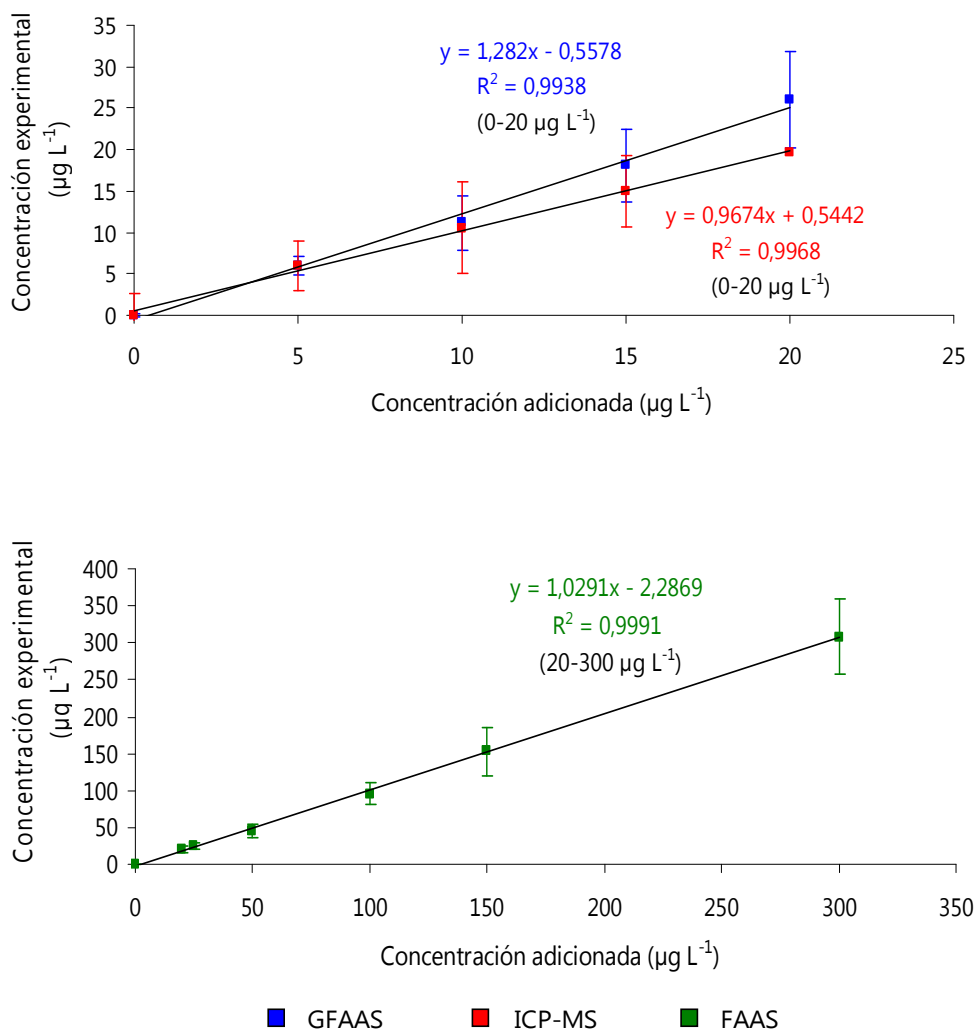


Figura II.B.15. Concentración experimental de plomo medida en la muestra frente a la adicionada aplicando el método de preconcentración de membrana líquida para muestras salinas. Comparación de la medida por GFAAS, ICP-MS o FAAS

II.B.7. Estudio de interferencias en el método de preconcentración con membrana líquida

Desde un punto de vista analítico, la presencia de compuestos interferentes produce errores sistemáticos o determinados y constituye uno de los principales problemas en el desarrollo de metodologías en el campo de la Química Analítica.

Al establecerse este método como sistema de preconcentración para trazas metálicas en agua de mar, surge la necesidad de evaluar las posibles interferencias, tanto salinas como metálicas, que pueden causar la multitud de especies presentes en este tipo de aguas. En las aguas naturales, se encuentran diferentes iones mayoritarios en forma de sales (sobre todo en muestras salinas), además de ciertos metales que pueden presentar cierta afinidad con el reactivo orgánico empleado como transportador de plomo. Por todo ello, se procedió al estudio de las potenciales interferencias, tanto salinas como metálicas, en el proceso de separación y preconcentración de Pb(II) mediante la membrana líquida de volumen propuesta.

II.B.7.1. Estudio de interferencias salinas

En este apartado se estudió la influencia de las distintas sales presentes en el agua de mar sobre la eficacia de preconcentración del método estudiado.

Para ello se preparó una muestra de agua de mar sintética con una concentración de plomo de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ [Grasshoff y col., 1999]. La composición del agua de mar sintética se detalla en la Tabla II.B.18 siendo la salinidad de 35 g L^{-1} . Algunas sales comerciales de las empleadas fueron de calidad Suprapur y otras de calidad para análisis. Por ello, se decidió realizar un blanco para evaluar las trazas de Pb(II) presente en los propios reactivos, para su consideración durante los análisis de las muestras. Se realizaron dos réplicas de muestra y blanco, siendo las fases receptoras analizadas por FAAS y por GFAAS respectivamente, y preparando la fase acuosa cargada como sigue:

- Fase acuosa cargada (V_0): Se tomaron 270 mL de agua de mar sintética (preparada a partir de la Tabla II.B.18), conteniendo $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II). Se adicionaron 30 mL de disolución reguladora a pH 8,5 con $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ ($0,8 \text{ mol L}^{-1}$) para acondicionar al pH de la muestra. De esa disolución, se tomaron 250 mL que se colocaron en la celda de preconcentración.

Tabla II.B.18. Composición salina del agua de mar sintética empleada en el estudio de las interferencias salinas del método de preconcentración propuesto para análisis de plomo [Grasshoff y col., 1999]

Especie interferente		Concentración en la muestra de agua de mar sintética (g L ⁻¹)
Sal	Iones en disolución	
NaCl	Na ⁺ , Cl ⁻	23,939
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Mg ²⁺ , Cl ⁻	10,825
Na ₂ SO ₄	Na ⁺ , SO ₄ ²⁻	3,994
CaCl ₂ ·H ₂ O	Ca ²⁺ , Cl ⁻	1,704
KCl	K ⁺ , Cl ⁻	0,677
NaHCO ₃	Na ⁺ , HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻	0,196
KBr	K ⁺ , Br ⁻	0,098
H ₃ BO ₃	H ₂ BO ₃ ⁻ , HBO ₃ ²⁻ , BO ₃ ³⁻	0,027
SrCl ₂ ·6H ₂ O	Sr ²⁺ , Cl ⁻	0,024
NaF	Na ⁺ , F ⁻	0,003

En la Tabla II.B.19 se muestran los resultados obtenidos al analizar las réplicas de la fase receptora. El valor de la concentración de plomo en la muestra de agua de mar sintética se obtuvo considerando el rendimiento medio del método, el factor de preconcentración de la celda, el factor de dilución al preparar la fase cargada y el valor de los blancos. Los resultados fueron adecuados, lo que indica que la matriz salina de agua de mar no interfiere en el proceso de transporte del plomo en las condiciones preestablecidas.

Tabla II.B.19. Influencia de la matriz salina del agua de mar sintética (Tabla II.B.18) en el método de separación/preconcentración de plomo (V_C: [Pb(II)]=25 µg L⁻¹; [NH₄Cl/NH₃]=0,8 mol L⁻¹; V_O: [2-HBET]=1,42·10⁻³ mol L⁻¹; V_R: [HNO₃]=0,3 mol L⁻¹; FPM=20,45; t=7 h) (n=2)

[Pb(II)] adicionado en la muestra (µg L ⁻¹)	Técnica de análisis	[Pb(II)] en la fase receptora (µg L ⁻¹)	[Pb(II)] en la muestra (µg L ⁻¹)
25	FAAS	398,04 ± 0,79	23,25 ± 3,62

II.B.7.2. Estudio de interferencias metálicas

Las aguas naturales contienen, además de una matriz salina, diversos metales en disolución, los cuales pueden enlazarse con el ligando orgánico de la membrana líquida y formar complejos, compitiendo con el Pb(II) durante el proceso de transporte del complejo metálico Pb(II)-2-HBET en la celda de preconcentración. Esto podría ocasionar una disminución en la eficacia del rendimiento del proceso de separación/preconcentración.

Para conocer este efecto, se preparó una muestra sintética que contenía $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de plomo, a la que se adicionaron diversos iones metálicos que con frecuencia se encuentran en las aguas salinas. Para seleccionar la concentración de estos iones en la fase cargada, se partió de las concentraciones usuales en el agua de mar recogidas en la bibliografía [Crompton, 2007] (Tabla II.B.20).

Así, se adicionaron 100 nmol L^{-1} de los metales que suelen presentarse con mayor concentración, es decir, Al(III), Fe(III), Mn(II), Ni(II), V(V), Zn(II) y Cu(II). Además, se adicionaron 3 nmol L^{-1} de los iones metálicos minoritarios, tales como Bi(III), Cd(II) y Co(II). Se investigó también el efecto de otro metal de gran interés medioambiental como es el Tl(I), a la misma concentración que los últimos. Para ello se preparó un patrón *multielemental* que contenía las concentraciones indicadas en la Tabla II.B.21, partiendo de disoluciones patrones comerciales de metal de 1.000 mg L^{-1} .

Tabla II.B.20. Intervalos de concentración de metales en aguas costeras y oceánicas [Crompton, 2007]

Especie interferente	Aguas costeras		Aguas oceánicas	
	$\mu\text{g L}^{-1}$	nmol L^{-1}	$\mu\text{g L}^{-1}$	nmol L^{-1}
Al(III)	6,40 - 63,0	237,2 - 2335	0,10 - 0,60	3,71 - 22,24
Fe(III)	1,0 - 250,0	17,91 - 4476	0,2 - 322	3,58 - 5765
Mn(II)	0,35 - 250,0	6,37 - 4550	0,018	0,33
Ni(II)	0,2 - 5,33	3,41 - 90,80	0,15 - 0,93	2,56 - 15,84
Cu(II)	0,069 - 20,0	1,09 - 315	0,0063 - 2,8	0,099 - 44,06
V(V)	0,01 - 5,1	0,20 - 100	0,45 - 2,00	8,83 - 39,26
Zn(II)	0,007 - 200,0	0,11 - 3059	0,05 - 10,9	0,76 - 167
Bi(III)	$5 \cdot 10^{-5}$ - 0,68	$2,4 \cdot 10^{-4}$ - 3,25	$< 3 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-6}$	$< 1,4 \cdot 10^{-5}$ - $2,4 \cdot 10^{-5}$
Cd(II)	0,015 - 5,0	0,13 - 44,48	0,01 - 0,13	0,09 - 1,12
Co(II)	<0,01 - 0,25	<0,17 - 4,24	0,003 - 0,16	0,05 - 2,72

Tabla II.B.21. Concentraciones metálicas adicionadas en la muestra sintética para el estudio de interferencias metálicas

Especie interferente	Concentración de la especie en la muestra		Concentración del patrón multielemental
	nmol L ⁻¹	µg L ⁻¹	µg L ⁻¹
Al(III)	100	2,70	162
Fe(III)		5,59	335,4
Mn(II)		5,49	329,4
Ni(II)		5,87	352,2
Cu(II)		5,09	305,4
V(V)		6,54	392,4
Zn(II)		6,35	381,0
Bi(III)	3	0,63	37,8
Cd(II)		0,34	20,4
Co(II)		0,18	10,8
Tl(I)		0,61	36,6

Se aplicó el método de preconcentración propuesto, por duplicado, preparando la fase cargada como sigue:

- **Fase acuosa cargada (V_C):** Se tomaron 270 mL de una muestra salina (30 g L⁻¹), que contenía 25 µg L⁻¹ de Pb(II) junto con las concentraciones metálicas indicadas en la Tabla II.B.21, por adición de 5 mL del patrón multielemental. A este volumen, se le adicionaron 30 mL de disolución reguladora a pH 8,5 con NH₄Cl/NH₃ (0,8 mol L⁻¹) para acondicionar al pH de la muestra. De esa disolución, se tomaron 250 mL que se colocaron en la celda de preconcentración.

Los blancos fueron determinados mediante la técnica de espectroscopía atómica GFAAS, mientras que las muestras con metal adicionado se determinaron por FAAS.

En la Tabla II.B.22 se muestran los resultados obtenidos para la concentración de plomo en la fase receptora y, a partir de ésta, en la muestra de agua de mar sintética. Se observa que los resultados son muy satisfactorios, lo que indica que los iones metálicos, a valores de concentración similares a los presentes en las aguas de mar, no interfieren sobre el proceso de transporte del plomo en las condiciones preestablecidas.

Tabla II.B.22. Estudios de interferencias metálicas en el método de separación/preconcentración de plomo (metales adicionados: ver Tabla II.B.21) (V_C : $[Pb(II)]=25 \mu g L^{-1}$; $[NH_4Cl/NH_3]=0,8 \text{ mol } L^{-1}$; $[NaCl]=30 \text{ g } L^{-1}$; V_O : $[2\text{-HBET}]=1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$; V_R : $[HNO_3]=0,3 \text{ mol } L^{-1}$; FPM=20,45; $t=7 \text{ h}$) ($n=2$)

[Pb(II)] adicionado en la muestra ($\mu g L^{-1}$)	Técnica de análisis	[Pb(II)] en la fase receptora ($\mu g L^{-1}$)	[Pb(II)] en la muestra ($\mu g L^{-1}$)
25	FAAS	$422,55 \pm 4,22$	$24,68 \pm 4,81$

II.B.8. Aplicación del método a muestras reales de agua de mar

El método de determinación de trazas de Pb(II) en medio acuoso salino a través de una membrana líquida de volumen empleando como agente transportador el reactivo orgánico 2-HBET ha sido validado analizando una muestra real de agua de mar. Para ello, los resultados fueron contrastados con los obtenidos empleando la voltamperometría de redisolución anódica con impulso diferencial (DPASV) (*Application Bulletin No. 231/2 e, Metrohm*). A su vez, este método voltamperométrico de referencia ha sido igualmente validado en el capítulo IV de esta tesis para el análisis de plomo en agua de mar, mediante el empleo de muestras de referencia certificada.

La muestra empleada fue tomada de la Bahía de Algeciras (muestreo del capítulo IV de la presente Tesis Doctoral) a la que se adicionó una concentración de ión metálico para que finalmente tuviera una concentración igual a la utilizada en estos estudios de caracterización del método ($25 \mu g L^{-1}$).

Las muestras de agua de mar fueron filtradas *in situ* y en continuo, desde la embarcación empleada en la toma de muestras, empleando filtros de membrana de $0,45 \mu m$ de tamaño de poro y fueron recogidas en recipientes de polietileno de baja densidad. Las muestras filtradas fueron acidificadas con HNO_3 (calidad Suprapur) una vez en el laboratorio, dejándose durante 2 semanas a temperatura ambiente con objeto de evitar la adsorción del metal en las paredes del recipiente que contiene la muestra. Tras este periodo de tiempo, las muestras se congelaron a $-20 \text{ } ^\circ C$ hasta su posterior análisis.

Para proceder a los análisis, y después de su descongelación, las muestras fueron digeridas durante 2 horas en tubos de cuarzo donde se colocaron 15 mL de la misma junto con 50 μL de H_2O_2 , empleando un digestor de UV. De esta forma se elimina la posible interferencia de la materia orgánica que pudiera estar complejando el metal. Esta digestión es necesaria para ambos métodos de análisis: el propuesto y el método por DPASV.

En la Tabla II.B.23 se recogen los resultados obtenidos para las muestras de agua de mar reales tanto por la técnica DPASV, como por el método de membrana líquida propuesto con posterior determinación mediante FAAS.

Tabla II.B.23. Concentración de Pb(II) en agua de mar real obtenida mediante el método de membrana líquida propuesto ($n=2$) (V_C : muestra de agua con adición de metal $[\text{Pb(II)}]=25 \mu\text{g L}^{-1}$; $[\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3]=0,8 \text{ mol L}^{-1}$; V_O : $[\text{2-HBET}]=1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; V_R : $[\text{HNO}_3]=0,3 \text{ mol L}^{-1}$; FPM=20,45; $t=7 \text{ h}$)

Muestra	Concentración de Pb(II) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	Membrana líquida (método propuesto) + FAAS ($n=2$)	DPASV (método de referencia) ($n=4$)
Agua de mar real	$25,18 \pm 4,41$	$27,58 \pm 1,72$

Con estos resultados muy satisfactorios se realizó un test de contraste o comparación de dos medias experimentales [Miller y Miller, 2002], empleando los resultados obtenidos por el método propuesto y los obtenidos usando el método establecido como referencia en estos estudios. De esta forma se puede valorar si la diferencia entre ambos valores es significativa. Para ello, se estableció la hipótesis nula H_0 , de que no existía diferencia significativa entre los valores obtenidos por ambos métodos.

Una vez se comprobó que las varianzas de ambos no eran significativamente diferentes (mediante la prueba *F de Fisher*), se calculó una varianza común s y el estadístico *t-Student*. Ambos parámetros se calcularon utilizando las siguientes expresiones:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

Partiendo de las ecuaciones anteriores, se calculó el valor de la desviación estándar conjunta (s) y, a continuación el valor de t . El valor de t se comparó con el valor tabulado en las tablas estadísticas, siendo el grado de libertad igual a (n_1+n_2-2) , es decir, 2. Por tanto, el valor de t tabulado para el contraste de dos colas para un intervalo de confianza del 95% es de 4,30. Por otro lado, el valor absoluto observado para el estadístico t fue de 0,71. Se cumplió que $t_{cal} < t_{tab}$, aceptándose de esta manera la hipótesis nula: ambos métodos ofrecían el mismo resultado, no estando sujetos a valores aleatorios significativos. Por todo ello, los resultados ofrecidos por ambos métodos eran significativamente iguales.

II.B.9. Conclusiones

En este capítulo se ha desarrollado un sistema de preconcentración por membrana líquida de volumen, empleando como reactivo transportador la tiosemicarbazona 2-hidroxibenzaldehído-N-etiltiosemicarbazona (2-HBET) disuelta en tolueno. El método se ha aplicado de forma muy satisfactoria al análisis de plomo en muestras reales de agua de mar. Este metal puede ser transportado con eficacia, con un factor de preconcentración en la celda empleada de 22,73. El método que se propone permite preconcentrar el metal en un rango muy amplio de concentraciones. Así se han estudiado concentraciones desde los $20 \mu\text{g L}^{-1}$ hasta los $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de plomo, con detección por espectroscopía de absorción atómica con llama, que es una técnica muy sencilla, rápida y de bajo coste para el análisis de este tipo de muestras y analito. También se puede aplicar este método a concentraciones inferiores a los $20 \mu\text{g L}^{-1}$ con detección por espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica. El método ofrece una precisión del 3,07% en la determinación de plomo y un límite de detección de $0,391 \mu\text{g L}^{-1}$ de metal. La eficacia del proceso es del $83,7 \pm 2,5 \%$ para un tiempo de preconcentración de 7 horas.

Capítulo III.

Estudio de dos bases de Schiff como quimiosensores moleculares para la determinación selectiva de hierro en disolución

Resumen

En este capítulo se ha estudiado la capacidad que presentan dos bases de Schiff como moléculas quimiosensoras fluorescentes para ser aplicadas en la detección de iones Fe(III) en disolución acuosa. Así, se sintetizan y estudian dos compuestos distintos: el *sensor a* (2-hidroxi-naftaldehído-N-feniltiosemicarbazona) y el *sensor b* (2,6-bis(N-(2-hidroxi-1-naftilmetilen)-diamino)-piridina). En el primer caso, la respuesta del sensor se traduce en un aumento de su fluorescencia en presencia del ión metálico Fe(III) con un rango dinámico de aplicabilidad del sensor es adecuado para el análisis de metales traza, mostrándose apto para ser empleado como sensor fluorescente de tipo "Off-On". El segundo sensor descrito, también es sensible a la presencia de Fe(III) en disolución aunque muestra como respuesta una atenuación ("quenching") de la fluorescencia del reactivo. Ambas moléculas sensoras son sensibles a la presencia del catión Fe(III) y presentan una muy buena selectividad, incluso en presencia de cantidades equimolares de otros metales traza como Cu(II) .

Los resultados obtenidos con estas moléculas quimiosensoras moleculares fluorescentes suponen los estudios previos para el desarrollo de futuros sensores ópticos con aplicaciones biológicas y medioambientales.

Capítulo III. A

Introducción

III.A.1. Introducción a los sensores químicos

Los estudios basados en el control de metales en el medio ambiente se ven enormemente favorecidos si se disponen de técnicas analíticas sensibles, sencillas, rápidas y de bajo coste para llevarlos a cabo. Los métodos convencionales para la determinación de metales pesados en muestras acuosas medioambientales requieren de largas y trabajosas etapas de muestreo y pretratamiento de muestras, las cuales aumentan la posible existencia de contaminación. Es por ello, que en los últimos años, ha despertado un gran interés el desarrollo de técnicas que sean sencillas, fáciles de usar y de bajo coste de mantenimiento, que proporcionen una respuesta inmediata y, sobre todo, que permitan la realización de análisis *in situ*, generalmente facilitados por el uso de dispositivos miniaturizados [McDonagh y col., 2008].

Así, la miniaturización de las técnicas y sistemas analíticos constituye un factor clave a la hora de desarrollar sistemas integrados en química analítica. De manera general, el objetivo de la miniaturización es contribuir al desarrollo de sistemas integrados y potencialmente automatizables, aplicables a los distintos estudios dentro del campo de la química. En numerosas ocasiones es una valiosa alternativa analítica a tener en cuenta por sus ventajas frente a otros procedimientos convencionales [Cámara y Pérez-Conde, 2011]:

- Permite la utilización de un menor tamaño o volumen de muestra (característica de gran interés en el caso de ser éste limitado) y conlleva un menor consumo de reactivos y disolventes. Como consecuencia, se genera una menor cantidad de residuos y, en el caso de tratarse de sustancias tóxicas, se minimiza la exposición del analista frente a éstas.
- Reducción de costes, por menor consumo de reactivos y disolventes, tiempo y energía.
- Posibilita el desarrollo de sistemas más integrados (simplificación del manejo, menor tamaño, portabilidad, automatización) y cerrados (menor riesgo de contaminación y pérdida de los analitos).
- Permite la reducción de las dimensiones de los dispositivos analíticos de medida convencionales, así como posibilita determinaciones *in situ* o en continuo.

Uno de los sistemas que cumplen estos requisitos y han sido de gran interés en los últimos años son los sensores químicos, dentro de los cuales destacan los sensores ópticos. Estos últimos sufren cambios en alguna propiedad óptica como consecuencia

de la interacción con el analito. Las magnitudes más habituales medidas son absorbancia, reflectancia, luminiscencia, fluorescencia, índice de refracción, etc. [Alegret y col., 2004].

Destaca entre ellos, el gran auge de nuevos sensores fluorescentes y la aplicación de éstos en los distintos campos, que se explica por la gran mejora de sensibilidad que presentan las técnicas de fluorescencia respecto a las de absorción molecular, además de que permiten obtener información de un determinado analito de manera rápida y en tiempo real. Sin embargo, los estudios persiguen fundamentalmente una respuesta lo más específica posible, donde la perturbación causada por el microentorno sea mínima.

III.A.1.1. Definición de sensor químico

Encontrar una definición universal del término *sensor* parece difícil, y existen ciertas discrepancias entre los científicos que tratan de establecerla. Una definición correcta podría ser: "dispositivo capaz de registrar de forma directa, continua y reversible un parámetro físico (*sensor físico*) o la concentración de una especie química (*sensor químico*)". Esta definición contiene las palabras "continua" y "reversible", que implican que un sensor ideal debe proporcionar lecturas en tiempo real. Esta característica, por lo general, es más fácil de cumplir en el caso de los sensores físicos que en los químicos [Pérez-Conde, 1996].

El término ***sensor químico*** hace referencia a dispositivos o instrumentos de uso sencillo, capaces de detectar, registrar y determinar especies atómicas, moleculares e iónicas cualitativa y/o cuantitativamente. Esta definición ha sido ampliada mediante otra que considera a los sensores químicos como dispositivos miniaturizados capaces de proporcionar información en tiempo real y on-line de la presencia de compuestos específicos o iones en muestras complejas [Narayanaswamy y Wolfbeis, 2004; Orellana y Moreno-Bondí, 2005; McDonagh y col., 2008]. Además, de acuerdo a la IUPAC, se define *biosensor* como un sensor específico cuyas reacciones bioquímicas se encuentran mediadas por enzimas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células. La principal diferencia con los sensores químicos es el carácter del receptor. En el caso de los sensores químicos, son generalmente compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos, mientras que en los biosensores son sustancias de naturaleza biológica [Pietrzak, 2013].

Idealmente, un *sensor químico* está formado por dos partes bien diferenciadas: un elemento de reconocimiento molecular o iónico (*receptor*), que interacciona selectivamente con un determinado componente de la muestra (analito), y un

elemento instrumental (*transductor*) que traduce la interacción en una señal procesable. Ambas partes pueden encontrarse de forma más o menos integradas, pero en todo caso deben estar conectadas, ya que la señal primaria generada en la reacción de reconocimiento (de tipo electroquímico, óptico, térmico o másico) será convertida por el transductor en último término en una señal secundaria, principalmente de tipo eléctrico [Alegret y col., 2004].

A su vez, se denominan *sensores químicos moleculares* a los sensores químicos en los que el receptor es una molécula. Es fácil encontrar ejemplos de este tipo de sensores en los organismos vivos, los cuales disponen de sensores especializados diseñados para detectar un amplio rango de moléculas, como toxinas y nutrientes. Un ejemplo son los sensores destinados al reconocimiento de los niveles de glucosa o de determinadas hormonas. Estos sistemas constituyen la forma natural de los llamados "sensores moleculares", en los cuales se encuentra la base de la biotecnología.

En los últimos años, este tipo de metodología de análisis está experimentando un gran auge. Así, los sensores moleculares se han empleado en un gran número de aplicaciones dentro del campo de la medicina, farmacia, alimentación y medio ambiente. Las tendencias actuales por conseguir avances en el campo de la investigación y así fomentar el desarrollo comercial, han provocado un crecimiento interesante en el área de los sensores moleculares, con el objetivo principal de desarrollar dispositivos baratos, sencillos y de fácil acoplamiento con instrumentos electrónicos para determinaciones diversas [Zhang y Hoshino, 2014a]. De ahí el interés de este capítulo de la tesis, donde se estudia la capacidad de dos moléculas orgánicas para actuar como *receptores moleculares* de utilidad en la detección de hierro.

III.A.2. Especies fluorescentes sensoras

El principio básico de la química de cualquier receptor que forma parte de un sensor químico óptico, se centra en la transformación de la concentración de analito en una señal analítica medible. De esta forma, la concentración del analito es medida mediante la variación de las propiedades ópticas del receptor [Yahya, 2011]. Se han descrito multitud de reactivos para la determinación de numerosos cationes inorgánicos. Entre ellos existen reactivos colorimétricos, indicadores fluorescentes e incluso moléculas orgánicas, normalmente no fluorescentes, que pueden llegar a serlo mediante determinados reactivos marcadores o derivatizantes [Barrero-Moreno, 1994].

Todo receptor molecular que se emplee debe cumplir dos requisitos fundamentales: ser altamente selectivo y sensible. Ello implica que reaccione preferentemente con el analito de interés, al mismo tiempo que permita detectar cambios notables y perfectamente medibles en las propiedades ópticas en respuesta a pequeñas variaciones en la concentración del analito de estudio. Otra característica importante, que deben cumplir estos reactivos, es la de proporcionar un enlace rápido y reversible con el analito de interés. Aunque existen numerosos reactivos ya conocidos y aplicados en la determinación de una gran diversidad de analitos, de forma continua siguen surgiendo estudios relacionados con el desarrollo y diseño de nuevos reactivos fluorescentes que puedan ser utilizados como indicadores de especies de interés.

La mayoría de las especies que absorben radiación en la región del ultravioleta o visible en disolución disipan su exceso de energía a través de colisiones con moléculas del disolvente, regresando finalmente al estado fundamental. Otras, en cambio, liberan su exceso energético devolviendo al medio toda o parte de la energía en forma de radiación en la zona del UV-visible. A este proceso se le conoce comúnmente como fotoluminiscencia y presenta dos variantes: fluorescencia o fosforescencia. La principal diferencia entre ellas radica en el hecho de que la fluorescencia tiene un tiempo de vida más corto que la fosforescencia. Este hecho hace que en la mayoría de las situaciones reales, desde un punto de vista analítico, sean más frecuentes las medidas de fluorescencia, considerado como un proceso de medición más adecuado y rápido que la fosforescencia [Cámara y Pérez-Conde, 2011].

Así pues, la fluorescencia molecular es un proceso de fotoluminiscencia en el que las moléculas se excitan mediante absorción de la radiación electromagnética, y posteriormente se relajan hasta el estado fundamental emitiendo su exceso de energía como fotones (Figura III.A.1). La característica más atractiva de la fluorescencia molecular es su sensibilidad inherente, por lo general de uno a tres órdenes de magnitud mayor que la ofrecida por la espectroscopía de absorción. Otra ventaja que posee es su amplio rango de linealidad, significativamente mayor que el que presenta la espectroscopía de absorción molecular. Sin embargo, el número de especies o sistemas químicos que pueden determinarse no es tan elevado como en los métodos de absorción, por ser relativamente limitado el número de compuestos que presentan fluorescencia apreciable [Cámara y Pérez-Conde, 2011].

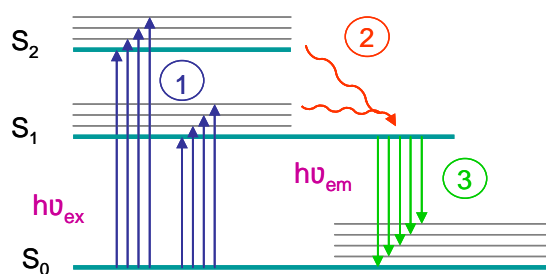


Figura III.A.1. Diagrama de Perrin-Jablonski representando los procesos implicados en la fluorescencia: 1) *Absorción*; 2) *Conversión interna*; 3) *Emisión* (imagen modificada de Goldys, 2009)

A pesar de que las moléculas absorbentes de radiación tienen potencial para ser especies fluorescentes, muchas no lo son porque su estructura permite otros tipos de mecanismos de relajación sin radiación que ocurren con mayor rapidez que la emisión de fluorescencia. Se define el *rendimiento cuántico* de la fluorescencia molecular como la fracción o cociente entre el número de moléculas con fluorescencia sobre el número total de moléculas excitadas; es decir, la de fotones emitidos sobre fotones absorbidos. Así, para moléculas muy fluorescentes la eficiencia cuántica será próxima a la unidad, mientras que puede alcanzar valores próximos a cero o incluso valor nulo en el caso de especies no fluorescentes.

Los compuestos que contienen anillos aromáticos en su estructura suelen presentar una emisión de fluorescencia bastante intensa. También presentan fluorescencia ciertos compuestos alifáticos o alicíclicos con grupos carbonilo, así como estructuras con dobles enlaces donde éstos se encuentran conjugados.

Muchos hidrocarburos aromáticos no sustituidos tienen fluorescencia en disolución, la cual aumenta con el número de anillos y su grado de condensación. La sustitución de un anillo aromático produce desviación en la longitud de onda de los máximos de absorción y cambios en los picos de fluorescencia. Además, es frecuente que la sustitución influya sobre la eficacia de la fluorescencia. Los hidrocarburos heterocíclicos más sencillos, como piridina, furano, tiofeno o pirrol, no presentan fluorescencia molecular, pero sí lo hacen determinadas estructuras de anillos fusionados que contienen estos compuestos, como por ejemplo la quinoleína, isoquinoleína o indol (Figura III.A.2) [Skoog y col., 2005].

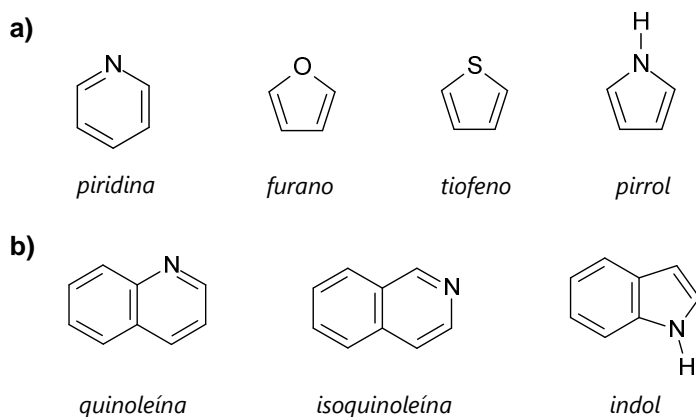


Figura III.A.2. a) Moléculas aromáticas características no fluorescentes; **b)** Compuestos aromáticos fluorescentes derivados de los anteriores [Skoog y col., 2005]

La fluorescencia puede también verse favorecida en compuestos que presenten cierta rigidez molecular. Tal es el caso del fluoreno (Figura III.A.3), el cual muestra una mayor fluorescencia al ser comparado con el bifenilo. Este comportamiento se debe a la rigidez que proporciona el grupo metileno que actúa de puente entre los dos anillos aromáticos en el fluoreno, mientras que los dos anillos aromáticos en el bifenilo pueden girar uno respecto del otro. El aumento de la rigidez también explica el aumento de la fluorescencia de ciertos quelatantes orgánicos cuando forman complejos con iones metálicos. Un ejemplo es el caso de la 8-hidroxiquinoleína, cuyas moléculas en disolución se desactivan fácilmente por colisiones con las moléculas del disolvente, disminuyendo su fluorescencia. Sin embargo, la rigidez del complejo metálico formado, por ejemplo en presencia de iones de Zn, intensifica la fluorescencia molecular (Figura III.A.4).

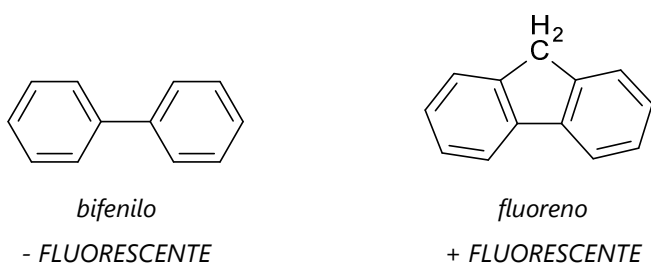


Figura III.A.3. Efecto de la rigidez molecular en la fluorescencia

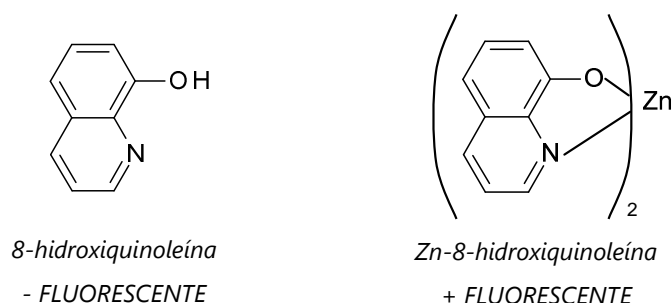


Figura III.A.4. Efecto de la rigidez molecular en la fluorescencia de la 8-hidroxiquinoleína al formar complejo metálico con el Zn

Para la mayoría de las moléculas, el rendimiento cuántico disminuye al aumentar la temperatura ya que ésta aumenta la frecuencia de colisiones, aumentando a su vez las probabilidades de relajación por colisión. Lo mismo ocurre al disminuir la viscosidad de los disolventes empleados [Skoog y col., 2005].

III.A.2.1. Mecanismos fotoluminiscentes

Como es sabido, algunos fluoróforos son sensibles a su entorno local, de forma que sus espectros de excitación y emisión, así como parámetros como el tiempo de vida, pueden verse modificados por el mismo. De esta forma, factores como la polaridad o la interacción con otras moléculas pueden modificar los espectros y sus parámetros. En consecuencia, la variación en la intensidad de la fluorescencia tras el proceso de coordinación ha sido comúnmente utilizada como señal de respuesta en sensores moleculares.

El medio en el cual tiene lugar el proceso de reconocimiento y unión reactivo-analito es de vital importancia. Parámetros como la naturaleza del disolvente (polaridad, capacidad de enlace por puentes de hidrógeno, carácter prótico o aprótico), pH, fuerza iónica, etc., juegan un papel muy importante debido a que pueden afectar no sólo a la eficiencia y selectividad del enlace, sino también a las características fotofísicas del fluoróforo (por ejemplo, el proceso de protonación puede competir con el de unión de un catión determinado). En numerosos casos, sobre todo en muestras biológicas, los disolventes empleados son mayoritariamente acuosos, por lo que es conveniente la utilización de un sensor soluble en agua. Por otra parte, en algunas aplicaciones analíticas (como las basadas en procesos de extracción) el sensor puede encontrarse disuelto en un medio orgánico [Lakowicz, 1994].

La posición del máximo de fluorescencia puede verse afectada por cambios en la estructura molecular, ya que éstos implican cambios en las energías de los estados fundamental y excitados. Además, el disolvente juega un papel importante en la posición espectral y la intensidad de las bandas de fluorescencia. La excitación viene acompañada de una transición electrónica que implica un cambio en el momento dipolar de la molécula. El nuevo estado electrónico puede verse más o menos estabilizado que el estado fundamental en el disolvente correspondiente (interacción dipolo-dipolo). El efecto es más acentuado cuando se pasa de un disolvente menos polar a uno más polar, por lo que se observan cambios en la λ de emisión con la variación de la polaridad del disolvente. La formación de enlaces de hidrógeno en el estado excitado de menor energía también podría provocar una pérdida en la intensidad de fluorescencia. Todos estos factores influirán en el diseño de un sensor fluorescente y en la importancia del medio donde se va a realizar la determinación analítica [García-Acosta, 2007].

Los mecanismos fotoluminiscentes que participan en la detección de los analitos en el caso de sensores fluorescentes son los siguientes [de Silva y col., 1997; Valeur y Leray, 2000]:

- Transferencia de carga (CT)
 - Transferencia de carga interna (ICT)
 - Transferencia de carga Metal-Ligando (MLCT)
 - Transferencia interna de carga con torsión (TICT)
 - Transferencia de carga a través de los enlaces
- Transferencia electrónica fotoinducida (PET)
- Formación/desaparición de exímeros (dímero excitado)
- Transferencia de energía electrónica (EET)
 - Transferencia de energía por resonancia (FRET o RET)
- Transferencia de protón en el estado excitado (ESPT)

Lo más frecuente es el uso de receptores que están diseñados para que, al coordinarse con determinados analitos, modulen procesos de transferencia electrónica fotoinducida (Photoinduced Electron Transfer, PET) [Geddes y Lakowicz, 2005; de Silva y col., 2009; Goldys, 2009]. El efecto *PET* es un proceso de transferencia electrónica que ocurre a distancia entre una molécula en estado excitado (fluoróforo) y alguna otra especie que puede actuar como dador o aceptor (amortiguador).

Este proceso está controlado por las energías relativas de los orbitales HOMO y LUMO del fluoróforo y del receptor (huésped). Por lo general, pueden presentarse 2 situaciones:

- Que la energía del HOMO del orbital externo del huésped sea intermedia entre las energías del HOMO y LUMO del fluoróforo. En este caso la excitación del *fluoróforo* deja una vacante en el orbital de más baja energía, el cual puede ser ocupado por un electrón procedente del orbital *huésped* (Figura III.A.5).

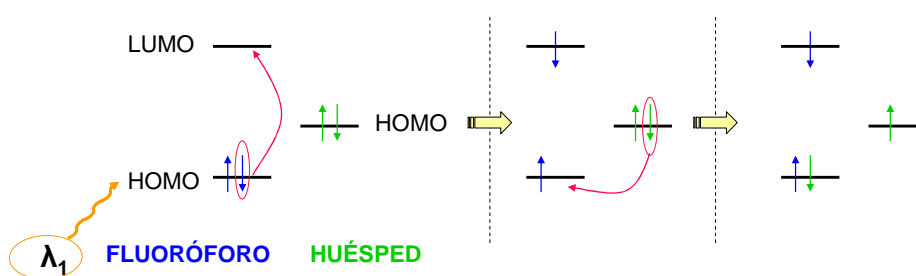


Figura III.A.5. Proceso de transferencia electrónica fotoinducida (PET) de reducción del fluoróforo por el huésped con pérdida de fluorescencia

- Que la energía del LUMO externo (huésped) sea intermedia entre las energías del HOMO y LUMO del fluoróforo. Cuando el orbital externo corresponde a un grupo con carácter oxidante, el electrón de elevada energía del fluoróforo excitado se puede transferir al LUMO externo originándose así un par de iones radicales de los que no se puede obtener ya la fluorescencia inicial (Figura III.A.6).

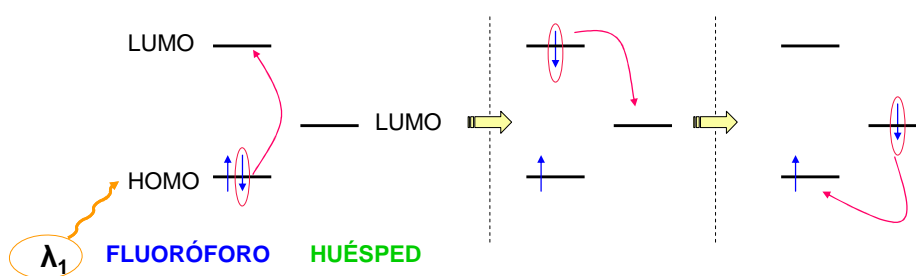


Figura III.A.6. Pérdida de fluorescencia por transferencia electrónica fotoinducida (PET) debido a amortiguadores que actúan como oxidantes

Estos efectos han sido utilizados para el diseño de quimiosensores que incorporan un fluoróforo (la unidad estructural donde se efectúan los fenómenos fotofísicos de excitación y emisión), un huésped que tiene un centro coordinante/receptor y un espaciador que mantiene ambas unidades a la distancia adecuada para que el proceso tenga lugar.

De forma general los quimiosensores basados en fenómenos de transferencia electrónica fotoinducida (PET) son de dos tipos:

- **Sensores tipo “Off-On”**, donde la fluorescencia natural del fluoróforo que se encuentra considerablemente reducida, sufre un incremento tras el proceso de asociación con el analito huésped. En la Figura III.A.7 se visualiza este proceso donde tienen lugar los siguientes pasos:
 - 1) La molécula es excitada con radiación de longitud de onda λ_1 , pasando un electrón desde el estado fundamental al excitado.
 - 2) La molécula excitada acepta un electrón del HOMO del huésped que contiene el lugar receptor/coordinante (*mecanismo PET*).
 - 3) Dado que el electrón promovido del fluoróforo no puede volver al orbital HOMO del que partió, no se produce el efecto de fluorescencia, produciéndose un estado “Off”.

Cuando el huésped compleja a un analito por el punto receptor puede producirse un cambio en las energías de los orbitales moleculares, como se observa en la segunda parte de la Figura III.A.7, dándose los pasos siguientes:

- 4) El fluoróforo se excita con la radiación y de nuevo uno de los electrones se transfiere al estado excitado.
- 5) La excitación del fluoróforo deja una vacante en el orbital de más baja energía.
- 6) La vacante no puede ser ocupada por ningún electrón del orbital HOMO del huésped porque el lugar receptor está complejando al analito y sus electrones están en un nivel de energía inferior a la vacante del fluoróforo. Por ello, se restituye la fluorescencia de la molécula que emite radiación con una longitud de onda λ_2 .

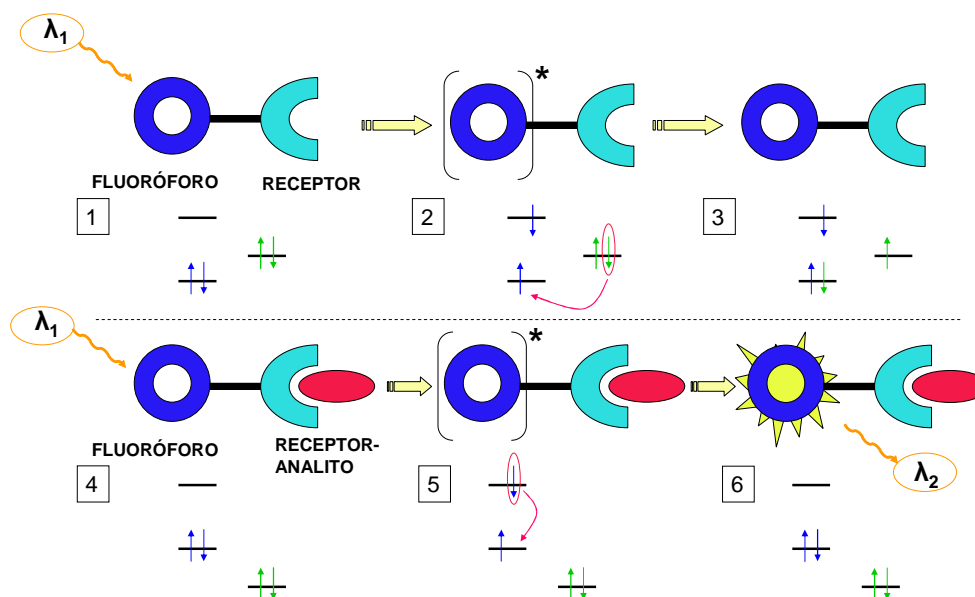


Figura III.A.7. Ejemplo de mecanismo PET en sensores de tipo "Off-On" (imagen basada en Jiménez-Jiménez, 2010)

- **Sensores de tipo "On-Off"**, donde la coordinación con el analito amortigua considerablemente la fluorescencia inicial del fluoróforo. En este caso, en la Figura III.A.8 se detalla el proceso de disminución de la fluorescencia inicial del sensor, el cual se centra en los siguientes pasos:

- 1) La molécula es excitada con radiación de longitud de onda λ_1 , promoviéndose un electrón desde el HOMO al LUMO del fluoróforo.
- 2) El electrón excitado vuelve a su estado fundamental, no siendo viable ningún proceso tipo PET, pues el nivel de energía de los electrones del huésped es superior al nivel excitado en el que se encuentra el electrón del fluoróforo.
- 3) Por tanto, se produce emisión de fluorescencia a una longitud de onda λ_2 al volver el electrón a su nivel fundamental.

Posteriormente, el enlace del huésped con el analito a través del punto receptor produce una modificación en la energía de los orbitales moleculares del huésped implicados en el proceso, de manera que la energía del HOMO del orbital externo sea intermedia entre las energías del HOMO y LUMO del fluoróforo, produciéndose así:

- 4) El complejo del fluoróforo se excita nuevamente, y uno de los electrones se transfiere al estado excitado.
- 5) Se produce la transferencia de un electrón del HOMO del lugar receptor/coordinante del huésped al nivel HOMO del fluoróforo (*mecanismo PET*).
- 6) Finalmente, se produce una disminución en la fluorescencia del sensor al no poder pasar el electrón excitado desde el nivel superior al fundamental.

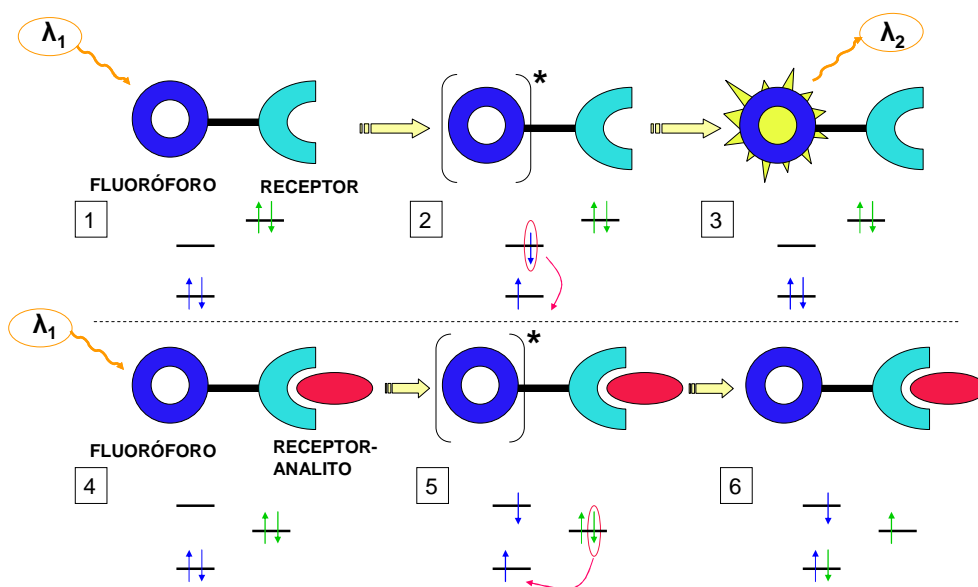


Figura III.A.8. Ejemplo de mecanismo PET en sensores de tipo "On-Off" (imagen basada en Jiménez-Jiménez, 2010)

III.A.3. Aplicaciones de los métodos de fluorescencia molecular

Se han desarrollado métodos de determinación cuantitativa basados en la fluorescencia para especies inorgánicas, orgánicas y bioquímicas, donde destacan las aplicaciones orientadas a la determinación de iones metálicos.

- **Determinación de especies orgánicas y bioquímicas**

La espectroscopía de fluorescencia molecular ha sido y es frecuentemente usada para la determinación de especies orgánicas, como la adenina, ácido antranílico, hidrocarburos aromáticos policíclicos, cisteína, guanina, naftoles, proteínas, ácido salicílico, ácido úrico, etc. Además de estos compuestos, se han podido determinar numerosos agentes medicinales de gran interés como la adrenalina, morfina, penicilina, fenobarbital, procaína, reserpina y dietilamina del ácido lisérgico (LSD).

Es frecuente la aplicación de la técnica de fluorescencia molecular en la determinación de productos alimenticios, sustancias farmacéuticas, muestras clínicas y productos naturales, ya que es elevado el número de compuestos de importancia fisiológica que emiten fluorescencia. A esta propiedad, se le suman las características de gran sensibilidad y selectividad que ofrece dicha técnica [Skoog y col., 2005].

- **Determinación de especies inorgánicas**

De manera general, los métodos de fluorescencia para la determinación de especies inorgánicas pueden dividirse en tres tipos, según el cambio que se produzca en la emisión de fluorescencia del fluoróforo (Figura III.A.9) [Lakowicz, 2006]:

- *Aumento de la fluorescencia*. El reactivo orgánico empleado como sensor es ligeramente fluorescente o no presenta fluorescencia alguna en ausencia de analito. Tras la formación del complejo se produce un aumento en la fluorescencia del fluoróforo.
- *Disminución de la fluorescencia ("quenching")*. El reactivo presenta una alta fluorescencia en ausencia del analito de interés, la cual se encuentra atenuada o puede incluso desaparecer totalmente cuando el analito se encuentra presente.

- *Cambio del máximo de emisión.* Se produce un cambio en la posición del máximo del pico de emisión dependiendo si en analito está presente o no.

Los más frecuentes son los métodos basados en un aumento de la fluorescencia, y los basados en la desactivación de la fluorescencia como resultado de la interacción del analito o especie de interés con un reactivo fluorescente ("quenching"). Este último fenómeno es bastante frecuente, ya que la relajación no radiante de los quelatos de metales de transición es tan eficiente que estas especies pocas veces muestran fluorescencia.

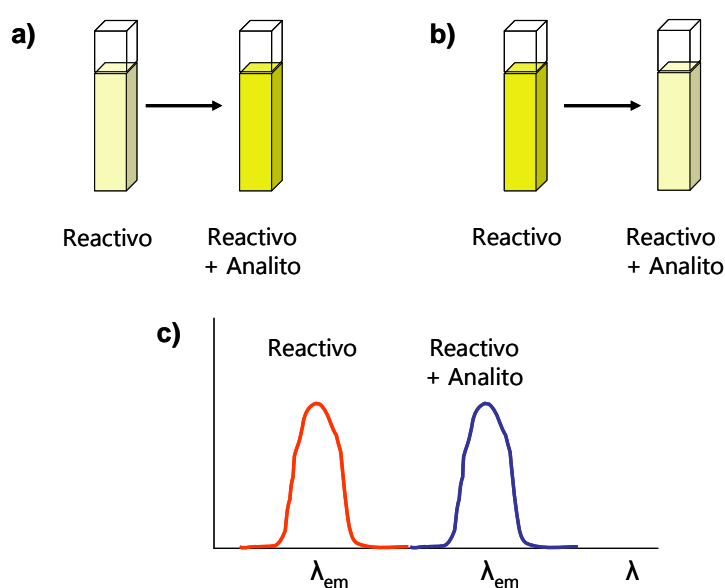


Figura III.A.9. Métodos de detección por fluorescencia: **a)** Aumento de la fluorescencia; **b)** Disminución de la fluorescencia o "quenching"; **c)** Cambio del máximo de emisión

III.A.3.1. Ventajas e inconvenientes de los métodos de detección por fluorescencia

Los principales inconvenientes de esta técnica son la necesidad de emplear reactivos que generen fluorescencia y la fuerte competencia de ésta frente a otros métodos como los atómicos y de masas, en cuanto a la determinación de trazas de especies inorgánicas. No obstante, presenta ventajas importantes que se enumeran a continuación [Cámara y Pérez-Conde, 2011]:

- Excelente sensibilidad, del orden de 10-1000 veces mejor que los métodos de absorción comparables. La sensibilidad se encuentra en la escala de $\mu\text{g L}^{-1}$, pudiendo mejorarse hasta el orden de los ng L^{-1} aumentando la intensidad de la radiación excitadora.
- Mejor selectividad que los métodos de espectrofotometría de absorción molecular. Conviene destacar que todas las especies fluorescentes absorben, pero no todas las que absorben son fluorescentes. El número de especies fluorescentes es mucho menor que el de absorbentes, por lo que las primeras presentan un menor número de interferencias que, además, pueden minimizarse mediante la selección apropiada de las longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) y de emisión (λ_{em}).
- Estos instrumentos son algo más complejos que los espectrofotómetros de absorción, pero de precio moderado.
- Presentan facilidad para ser insertados como detectores en sistemas cromatográficos y de flujo continuo.

Así pues, la detección basada en los fenómenos de fluorescencia se encuentra entre las técnicas de caracterización más sensibles, siendo la intensidad de emisión dependiente de una gran variedad de parámetros físico-químicos y ambientales a tener en cuenta, tales como rendimiento cuántico de la fluorescencia, temperatura, pH, propiedades del disolvente como la viscosidad o polaridad, concentración de oxígeno, impurezas, átomos pesados o iones, concentración del fluoróforo, longitud de onda de excitación y emisión, polarización, intensidad de excitación y tiempo tras la excitación [Goldys, 2009].

III.A.3.2. Aplicación de fluoróforos en la determinación de iones metálicos

El reconocimiento y la detección de iones es un tema de gran interés debido a la implicación de éstos en multitud de áreas, tales como la química, biología, medicina (bioquímica clínica) o medio ambiente, entre otras [Jiang y col., 2014]. Particular atención ha recibido el desarrollo de sensores con capacidad para detectar selectivamente ciertos cationes, los cuales están implicados en procesos biológicos (sodio, potasio, calcio, magnesio), en diagnóstico clínico (litio, potasio, aluminio) o en procesos de contaminación (plomo, cadmio, mercurio).

Dentro de los métodos existentes para la determinación de iones, los métodos basados en la fluorescencia ofrecen claras ventajas en términos de sensibilidad, selectividad, tiempo de respuesta y posibilidad de realizar estudios a tiempo real por teledetección mediante el empleo de fibras ópticas [Callan y col., 2005].

La detección de iones requiere de una especial atención en el diseño del sensor fluorescente, sin obviar en ningún momento que su función se sustenta tanto en su capacidad de reconocimiento como en el proceso de transformación de la información química en una señal óptica. El reconocimiento es el responsable de la selectividad y eficiencia del enlace entre el sensor y el analito, y la segunda propiedad permite convertir la información química en una señal óptica, que sea lo más selectiva posible y proceda únicamente del analito de interés.

Los cambios fotofísicos que tienen lugar en un sensor fluorescente tras la unión con un determinado ión pueden ser consecuencia de varios procesos fotoinducidos como: transferencia electrónica, transferencia de carga, transferencia de energía, formación o desaparición de exímeros, etc. Estos cambios debidos al reconocimiento deben de ser tan acusados como sea posible. Es preferible que el sensor sufra desplazamientos de los espectros de emisión y/o excitación (o formación o desaparición de bandas), a que el sensor sufra cambios únicamente en la intensidad de la señal de fluorescencia. De hecho, en este último caso y tras la calibración, lo que suele calcularse es la razón entre las intensidades de fluorescencia de dos bandas a dos longitudes de onda adecuadas de emisión/excitación (estudios ratiométricos). Esta relación de intensidades ofrece una medida de la concentración de analito, la cual es independiente de la concentración de sensor (siempre y cuando el ión se encuentre en exceso) [Lakowicz, 1994].

Sousa introdujo el concepto de quimiosensor fluorescente en la detección de cationes en el año 1977. Así, describió el efecto que causaban los metales alcalinos sobre las propiedades fluorescentes de dos éteres corona derivados del naftaleno, mostrados en la Figura III.A.10 (1 y 2) [Sousa y Larson, 1977]. Más tarde, en 1986, A.P. de Silva aplicó el término "*switch on*" para explicar incrementos en la intensidad de emisión de sensores fluorescentes. Tal fue el caso de una disolución en etanol del compuesto mostrado en la Figura III.A.10 (3), cuando se adicionaban iones Na^+ y K^+ [de Silva y de Silva, 1986]. La aplicación de los éteres coronas supuso una gran revolución en el reconocimiento selectivo de cationes, especialmente de los metales alcalinos.

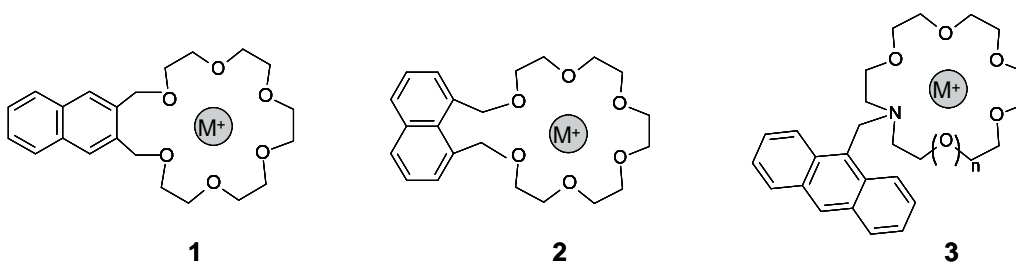


Figura III.A.10. Primeros compuestos fluorescentes estudiados tras su coordinación con metales alcalinos: 1 y 2 [Sousa y Larson, 1977]; 3 [de Silva y de Silva, 1986]

La creciente preocupación por determinar metales pesados como el Hg(II) , Ag(I) , Cd(II) , Cr(III) , Cr(VI) , Pb(II) , Tl(I) , Co(II) y Ni(II) (por orden de toxicidad decreciente) ha suscitado un gran aumento en los estudios sobre la caracterización y aplicación de nuevas moléculas quimiosensoras para la detección de estos metales, los cuales son bastante interesantes desde un punto de vista biológico y medioambiental. De hecho, los trabajos relacionados con la aplicación de sensores fluorescentes a la determinación de iones metálicos han experimentado un crecimiento exponencial en los últimos años. En la Figura III.A.11 se muestra una estimación del número relativo de trabajos publicados, entre los años 2000-2011, en revistas con alto índice de impacto sobre la aplicación de sensores fluorescentes para la determinación de metales tóxicos y esenciales (Co y Ni) en disolución. Los sensores capaces de detectar más de un metal de forma simultánea se denominan sensores multi-elemento [Dutta y Das, 2012].

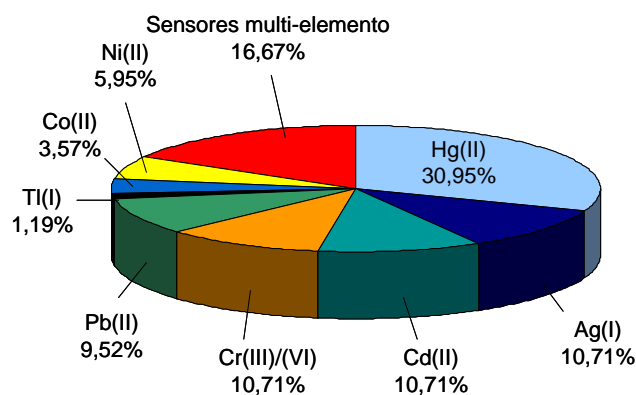


Figura III.A.11. Número relativo de trabajos publicados sobre sensores fluorescentes para la determinación de cationes metálicos en disolución (Imagen y datos tomados de Dutta y Das, 2012)

Así, a lo largo de los años han sido muchos los compuestos sintetizados y aplicados para la determinación de un gran número de iones metálicos en disolución. La mayoría de los sensores fluorescentes se basan en medidas de la intensidad emitida por los mismos, donde se producen cambios en respuesta al analito/s de interés (generalmente un aumento o disminución de la intensidad de fluorescencia inicial). Diversos sensores han sido preparados en disolución para la determinación de analitos metálicos de gran interés. En la Tabla III.A.1 se recogen algunos trabajos sobre estas moléculas sensoras empleadas para el estudio selectivo de algunos metales. Estos reactivos fluorimétricos, aplicados con gran éxito, son compuestos aromáticos con dos o más grupos funcionales donadores con tendencia a formar quelatos con los iones metálicos. Dos de los más destacados son la 8-hidroxiquinoleína y la rodamina B.

Tabla III.A.1. Revisión bibliográfica de moléculas sensoras (mono y multi-elemento) en disolución aplicadas a la determinación fluorimétrica de metales pesados

Catión metálico	Quimiosensor fluorescente	Tipo sensor	Referencia
Hg(II)	Derivado de diclorofluoresceína y piperazinil-cumarina	On-Off	Kim y col., 2010
	2-(1-(antraceno-9-ilmetil)-1H-pirazol-3-il)-piridina	On-Off	Mandal y col., 2010
	Derivado de rodamina con Pt(II)	Off-On	Zhang y col., 2010b
	Conjugado de antracenil-imino-glucosil	Off-On	Mitra y col., 2011
	Derivado de rodamina hidrazona 6G y furfural	Off-On	Wang y col., 2011a
	Derivado de rodamina B	Off-On	Yan y col., 2012
	Basado en moléculas de pireno y triazol	On-Off	Cao y col., 2013
	Derivado de rodamina B hidrazona	Off-On	Dong y col., 2013
	Derivado de rodamina B hidrazona	Off-On	Lee y col., 2013
	Derivado de rodamina B y piperonal	Off-On	Zhang y col., 2013b
	Basado en rodamina B y dietil fosfato	Off-On	Zhang y col., 2013c
Ag(I)	Derivado de bis(2-(etiltio)etil)amina y naftalimida	Off-On	Xu y col., 2007
	Derivado de tetrametil-rosamina	Off-On	Iyoshi y col., 2008
	Derivado de porfirina	On-Off	Zhu y col., 2008
	Formado por ftalocianina y derivado del benzofurano	On-Off	Kandaz y col., 2009
	Formado por macromolécula cíclica dibenzo-NS ₂ O ₂	Off-On	Park y col., 2009
	Conjugado de cumarina Se ₂ N	Off-On	Huang y col., 2011
	Derivado de vainillina y naftalimida	On-Off	Zhou y col., 2012a
Cd(II)	Derivado de boro-dipirrometano (BODIPY) y piridina	Off-On	Peng y col., 2007b
	Derivado de naftiridina	Off-On	Zhou y col., 2008
	Derivado de 8-hidroxiquinoleína	Off-On	Li y col., 2011b
	Derivado de acridina	Off-On	Wang y col., 2011b
	Derivado de tricarbocianina	Off-On	Yang y col., 2011
	Derivado de 1,10-fenantrolina	On-Off	Pamuk y Algi, 2012
	Derivado de 8-hidroxiquinoleína	Off-On	Jiang y col., 2014
	Derivados de hexaazatrifenileno	Off-On	Zhang y col., 2014b

Tabla III.A.1 (cont.). Revisión bibliográfica de moléculas sensoras (mono y multi-elemento) en disolución aplicadas a la determinación fluorimétrica de metales pesados

Catión metálico	Quimiosensor fluorescente	Tipo sensor	Referencia
Cr(III)	Derivado de rodamina B	Off-On	Weerasinghe y col., 2009
	Ácido 4-acridona-4-carboxílico	On-Off	Karak y col., 2011
	Basado en naftiridina y difenilfluoranteno	Off-On	Li y col., 2011c
	Derivados de tiazolotiazol	Off-On	Jung y col., 2012
	Derivado de rodamina B	Off-On	Xie y col., 2013
	Derivado de glutamina	Off-On	Zhao y col., 2013c
	Derivado de rodamina B	Off-On	Zhou y col., 2013
Cr(VI)	Derivado de rodamina hidrazona	Off-On	Zheng y col., 2009
Pb(II)	Derivado de porfirina	On-Off	Bozkurt y col., 2009
	Derivados de fenantrolina y fenantreno	Off-On	Goswami y Chakrabarty, 2010
	Conjugado de rodamina-fenilurea	Off-On	Hu y col., 2010
	Derivado de lisina	On-Off	Ma y col., 2012a
Co(II)	Complejo multisustituido basado en fenol-rutenio(II) tris(bipiridina)	On-Off	Li y col., 2006
	Formado por fluoresceína y rodamina	Off-On	Abebe y col., 2011
Ni(II)	Derivado de boro-dipirrometano (BODIPY)	Off-On	Dodani y col., 2009
	Derivado de diimida del perileno-tetracarboxílico	Off-On	Wang y col., 2010f
	(7E,8E)-N1',N3'-bis(1-(2-hidroxifenil)etilideno) malonohidrazida	Off-On	Fegade y col., 2014
Cu(II)	Derivado de rodamina B	Off-On	Zhao y col., 2009
	Derivado de rodamina 6G	Off-On	Huang y col., 2010
	Derivado de rodamina B	Off-On	Yu y col., 2010
	Derivado de rodamina B	Off-On	Xu y col., 2011b
	Derivado de rodamina B	On-Off	Ding y col., 2012
	Derivado de bencimidazol	On-Off	Jayabharathi y col., 2012
	Derivado de rodamina 6G	Off-On	Ma y col., 2012b
	Derivado de rodamina 6G	On-Off	Wang y col., 2012c
	Derivado de pirazolina	On-Off	Hu y col., 2013b
	Formado por derivado de rodamina B y 8-hidroxiquinoleína	Off-On	Wang y col., 2013a

Tabla III.A.1 (cont.). Revisión bibliográfica de moléculas sensoras (mono y multi-elemento) en disolución aplicadas a la determinación fluorimétrica de metales pesados

Catión metálico	Quimiosensor fluorescente	Tipo sensor	Referencia
Cu (II)	Hidrazona derivada de cumarina	On-Off	Xu y col., 2013b
	Semicarbazida de rodamina B	Off-On	Saleem y Lee, 2014
Zn(II)	Derivado de aminobenzenosulfonamido-quinolino- β -ciclodextrina	Off-On	Liu y col., 2007b
	Derivado de 7-hidroxiquinoleína	Off-On	Chen y col., 2009
	Derivado de hidroxinaftaleno e indol	Off-On	Li y col., 2010
	Derivado de pirazolina	Off-On	Gong y col., 2011
	Conjugado de fluoresceína-cumarina	Off-On	An y col., 2013
	Derivado de 2-metilquinoleína	Off-On	Gao y col., 2013
	Derivado de dicetopirrololpirrol	Off-On	Zhang y col., 2013d
	Derivado de quinoleína	Off-On	Kim y col., 2014
Cr(III), Hg(II)	Derivado de naftaleno sulfonamida	Off-On para Cr(III) On-Off para Hg(II)	Al-Sayah y El-Chami, 2009
Co(II), Ni(II)	4'-4-(1,2,4-triazol-1-il)-fenil-2,2':6',2''-terpiridina	On-Off	Wang y col., 2012b
Al(III), Cu(II)	Derivado de naftol	Off-On para Al(III) On-Off para Cu(II)	Jang y col., 2013
Al(III), Cr(III), In(III), Ga(III), Fe(III)	10-(2-(((piridin-2-il)metilamino)metil)fenol)metil-antraceno	Off-On	Kim y col., 2013b
Zn(II), Al(III)	Formado por derivado de 2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H-benzo[ij]quinolizidina e imidazol	Off-On	Choi y col., 2014
Al(III), Cr(III), Fe(III)	Formado por antraceno e imidazol	Off-On	Samanta y col., 2014
Cu(II), Hg(II)	poli 3-([1-(2-hidrazino-2-oxoetil)piperidin-4-ilideno]metil}tiofeno y poli 3-([1-(3-hidrazino-3-oxopropil)piperidin-4-ilideno]metil}tiofeno	On-Off	Wang y col., 2014a

III.A.3.3. Quimiosensores moleculares aplicados a la determinación de hierro en disolución

El hierro es un elemento esencial necesario para un adecuado funcionamiento fisiológico de los organismos. Juega un papel fundamental en numerosos procesos celulares que tienen lugar en el cuerpo humano, como la generación de energía, transporte de oxígeno y síntesis de ADN, entre otros. Una de las principales propiedades que presenta este metal es su ciclo redox entre las dos formas estables Fe(II) y Fe(III), que permiten a éste actuar como dador o aceptor de electrones, y que lo convierten en un cofactor muy adecuado en un gran número de enzimas críticas para el correcto funcionamiento del organismo [Lieu y col., 2001; Hentze y col., 2010]. Esta propiedad lo hace capaz de participar en reacciones que abarcan gran parte de la bioquímica, incluyendo aquéllas que controlan el flujo de electrones a través de rutas bioenergéticas, la síntesis de ADN y el aporte de oxígeno a los tejidos. Entre las hemoproteínas que utilizan hierro como cofactor se encuentran las que participan en el metabolismo del oxígeno (oxidasas, peroxidasas, catalasas e hidroxilasas), en la transferencia de electrones (citocromos) y en el transporte de oxígeno (hemoglobina).

Bajo ciertas condiciones, el Fe es el agente pro-oxidante más potente debido a su alta disponibilidad. Éste promueve la excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y provoca la oxidación de proteínas, ADN y fosfolípidos, derivando en alteraciones estructurales y funcionales. La mayoría de las reacciones en las que participa el Fe se basan en la reacción de Fenton, mediante la cual se produce la generación de radicales altamente reactivos del hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) a partir del peróxido de hidrógeno en presencia de algunos metales de transición, tales como el hierro. La formación de estos radicales altamente inestables puede afectar a las macromoléculas biológicas, lo cual sugiere el papel de estos metales en estos desarreglos o alteraciones. Por consiguiente, alteraciones en la homeostasis del hierro, ya sea por un exceso o un defecto de los niveles de éste, representan algunas de las enfermedades más comunes en los seres humanos. Hay evidencias de que muchos metales de transición (entre ellos el Fe) pueden ocasionar daños neuronales, que derivan en enfermedades neurodegenerativas [Rivera-Mancía y col., 2010; Marcus y Dharmalingam, 2014].

En consecuencia, es de gran interés poder determinar el nivel de Fe presente en los medios biológicos y saber, por tanto, si existe un exceso o un defecto de este analito. Por ello, surgió la necesidad de desarrollar sistemas de detección que fuesen fáciles de aplicar, a la vez que rápidos, y que permitan determinar la concentración de Fe(III) en medios acuosos. Los sensores fluorescentes resultaron ser unos métodos muy útiles para ello [Callan y col., 2005].

El número de publicaciones científicas en los que se desarrollan y aplican compuestos orgánicos fluorescentes con el fin de determinar Fe(III) no es muy elevado en comparación con otro tipo de metales de transición. En este capítulo se han sintetizado, caracterizado y aplicado dos quimiosensores moleculares fluorescentes para la determinación selectiva de Fe(III), basados tanto en la atenuación como el aumento de la fluorescencia (en cada uno de los casos) de ambas bases de Schiff.

En 1995, se desarrolló un sensor óptico para la determinación del ión ferroso Fe(II) mediante la adsorción del reactivo Calceína Azul (ácido 4-metilumbeliferona-8-metiliminodiacético) sobre una superficie hidrofóbica de una célula de flujo. El sensor estaba basado en el fenómeno de disminución de la fluorescencia (quenching), el cual era sensible a los iones ferrosos en un amplio rango de gran interés analítico ($1\text{-}500\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$). Este método presentó inconvenientes como fuertes interferencias por parte de otros iones, sobre todo el Mn(II). Además, el tiempo hasta alcanzar una fluorescencia en estado estacionario era elevado y estaba controlado por lentos procesos de complejación y transferencia de masa [Noiré y Duréault, 1995].

Pulido-Tofiño y colaboradores diseñaron un sensor fluorescente de flujo para la determinación consecutiva de Fe(III) y Fe total. Este sensor permitió realizar estudios de especiación, calculándose el contenido en Fe(II) como la diferencia entre el Fe inorgánico total y el Fe(III). La fase reactiva o sensora, la cual presentaba gran afinidad por complejar al catión Fe(III), consistía en el sideróforo fluorescente Pioverdin inmovilizado mediante una unión covalente sobre un vidrio con estructura de poro controlada (Control Pore Glass, CPG). El pigmento reaccionaba selectivamente con el Fe(III), produciendo un descenso en la emisión de la fluorescencia. Por tanto, el Fe inorgánico total era determinado como Fe(III) tras sufrir una oxidación on-line en una mini-columna que contenía resina de intercambio iónico con persulfato inmovilizado. El método permitió la determinación de Fe(III) en un rango de $3\text{-}200\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, siendo aplicado de modo satisfactorio en estudios de especiación de hierro ((Fe(II)/Fe(III)) en muestras de agua sintética, de grifo y de pozo, así como en muestras de vinos [Pulido-Tofiño y col., 2000].

Se estudiaron las propiedades fotoluminiscentes del fluoróforo orgánico derivado del benzofurano, el compuesto bis-(7-metoxibenzofurano-2-il)cetoxima al reaccionar con el catión Fe(III). Dichas propiedades fueron estudiadas en diferentes disolventes y matrices poliméricas mediante espectroscopía de absorción y emisión. Se observó una respuesta selectiva para dicho metal con disminución en la intensidad de la fluorescencia observada inicialmente, con un rango de trabajo dinámico de $1,0\cdot 10^{-6}$ a $8,0\cdot 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ de Fe(III). Además, no se observaron interferencias significativas respecto al ión Fe(II) y otros cationes probados [Oter y col., 2007a].

En 2009, Lin y colaboradores sintetizaron un derivado del fenantroimidazol que actuaba como sensor fluorescente ratiométrico. Tras reaccionar con Fe(III), el sensor mostraba una respuesta fluorescente de tipo ratiométrica, con un aumento en la razón de intensidades de emisión a 440 y 500 nm (I_{440}/I_{500}) de 0,36 a 3,24. El rango de detección oscilaba entre $1,0 \cdot 10^{-5}$ - $1,5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹. Además, el sensor mostraba una alta selectividad por el hierro trivalente sobre otros iones metálicos [Lin y col., 2009].

Queirós y colaboradores diseñaron un sensor basado en la propiedad fluorescente de un compuesto que contenía una unidad de catecol, con un alto poder quelatante. El sensor fue sintetizado con éxito y sus propiedades fotofísicas fueron determinadas y aplicadas a la determinación de Fe(III) en medios biológicos y otras aplicaciones analíticas [Queirós y col., 2012]. De la misma forma, han sido investigados varios sensores en disolución para la determinación de Fe [Li y col., 2012; Liu y Wu., 2012; She y col., 2012].

En cuanto a los trabajos más recientes, un novedoso sensor fluorescente fue diseñado para la determinación de iones Fe(III) en disolución acuosa. El sistema sensor fue preparado utilizando como molécula sensora el reactivo 5-(8-hidroxi-2-quinolinilmetil)-2,8-ditio-5-aza-2,6-piridinofano. Este fluoróforo presentó una gran tendencia a reaccionar de forma selectiva y rápida con Fe(III), mostrando una atenuación de la intensidad de fluorescencia. Con este sistema se obtuvo un rango lineal de aplicación de $6,0 \cdot 10^{-4}$ a $1,0 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹. Además de una alta estabilidad y reproducibilidad, el sensor mostró una gran selectividad por el Fe(III), aún coexistiendo éste con otros cationes. Además, se aplicó exitosamente en la determinación de hierro trivalente en arroz, espinaca y diferentes muestras de agua. También fue aplicado en estudios de especiación de Fe(II)/Fe(III) (mediante medida del Fe(II) en forma de Fe(III), tras una oxidación previa de la muestra) [Shamsipur y col., 2013]. Además, se han desarrollado un gran número de sensores fluorescentes para su aplicación en disolución [Bordini y col., 2013; Hu y col., 2013c; Liu y col., 2013b; Yi y col., 2013; Gao y col., 2014; Li y col., 2014a; Li y col., 2014b; Li y col., 2014c; Wang y col., 2014b].

Capítulo III. B

Parte experimental

III.B.1. Bases de Schiff como ligandos fluorogénicos en el desarrollo de sensores químicos para la determinación de Fe

En este capítulo se estudia la aplicación de dos moléculas sensoras con el objetivo de determinar Fe(III) en medio acuoso, siendo este análisis de gran importancia biológica y medioambiental [Samanta y col., 2014]. Dado que el número de sensores fluorescentes desarrollados y aplicados al análisis de Fe en medio acuoso no es muy elevado, estos estudios pueden resultar de gran interés. Para ello, se han propuesto dos reactivos con propiedades fluorescentes y quelatantes que han resultado ser muy adecuados para tal fin. Tras la interacción del sensor en disolución con el analito, una de las moléculas sensoras tiene como respuesta un aumento en la intensidad de fluorescencia del sensor, mientras que la otra muestra una atenuación de dicha propiedad. Estas moléculas pueden ser inmovilizadas en un soporte adecuado para su aplicación en la determinación de Fe(III) en continuo.

Los sistemas sensores emplean con frecuencia moléculas altamente complejas, de difícil síntesis o de elevado coste. Sin embargo, las bases de Schiff han mostrado interesantes propiedades como agentes quelatantes, y han sido ampliamente aplicadas con resultados interesantes en la separación y preconcentración de metales pesados (como se vio en el Capítulo II de la presente Tesis Doctoral), ofreciendo grandes ventajas.

En general, las *bases de Schiff* se caracterizan por tener en su estructura un grupo *imino* o *azometino*, que consiste en un grupo funcional que presenta un doble enlace carbono-nitrógeno, donde el nitrógeno se encuentra unido a un grupo alquilo o arilo ($C=N-R$).

Como ya se indicó en el capítulo II, las tiosemicarbazonas ($R_1R_2-C=N-NH-CS-N-R_3R_4$) son un ejemplo de este tipo de compuestos. Tienen una alta capacidad para formar complejos metálicos con los metales de transición, debido a la presencia de elementos con carácter donador N y S, además del O que puede estar presente en los sustituyentes. Además, ofrecen una geometría idónea para la complejación de determinados iones metálicos, caracterizándose así estos compuestos por una gran selectividad, sensibilidad y estabilidad química [Aksuner, 2009].

Las tiosemicarbazonas, y en particular las tiosemicarbazonas heterocíclicas, han sido extensamente estudiadas como compuestos quelatantes para el hierro, e incluso han sido aplicadas en el tratamiento contra el cáncer. Su elevada afinidad por este metal hace a estos compuestos bastante idóneos para el "secuestro" de hierro, previniendo o evitando la incorporación de este elemento en los sitios activos de la

enzima ribonucleasa reductasa (RR), involucrada en la síntesis de ADN. Por esta razón, compuestos que actúan como quelatantes del hierro han sido empleados, como tales o en combinación con otras sustancias, en terapias antiproliferativas [Finch y col., 2000; Natarajan y Mathews, 2011]. De esta manera, un gran número de compuestos derivados de tiosemicarbazonas han sido desarrollados e investigados por sus potenciales características como agentes quimioterapéuticos [Lovejoy y Richardson, 2002; Dilworth y Hueting, 2012]. Estos compuestos, además de presentar una alta afinidad por el Fe(III), poseen en muchas ocasiones una fluorescencia intrínseca en su estructura, lo que los hace altamente atractivos para ser estudiados como sensores fluorescentes muy sensibles. También han sido utilizados como sensores colorimétricos de este metal [Oter y col., 2007b; Aydin y col., 2012; Dong y col., 2010; Devaraj y col., 2012; Narayanaswamy y Govindaraju, 2012; Zhou y col., 2012b; Bordini y col., 2013; Meng y col., 2013; Wang y col., 2013b; Wei y col., 2013; Yang y col., 2013; Choi y col., 2014]. Sin embargo, y a pesar de todas estas propiedades, en la actualidad, la capacidad de estos compuestos como sensores ópticos para la determinación de hierro ha sido poco explotada.

III.B.2. Sensor a: 2-hidroxi-naftaldehído-N-feniltiosemicarbazona (2-HNFT)

III.B.2.1. Síntesis y caracterización química

El compuesto 2-hidroxi-naftaldehído-N-feniltiosemicarbazona (2-HNFT), también nombrado como N-fenil-2-(2-hidroxinaftalen-1-ilmetileno)hidracina carbotioamida, pertenece al grupo de las tiosemicarbazonas, y posee tres átomos implicados en la formación de enlaces de coordinación con los cationes metálicos. Estas posiciones son el oxígeno (O) del grupo hidroxilo ubicado en uno de los anillos aromáticos, el nitrógeno (N) del grupo azometino y el azufre (S) del grupo tiocarbonilo [Prabhakaran y col., 2011] (átomos coloreados en la Figura III.B.1).

Como ya se expuso, la formación de una tiosemicarbazona es una simple reacción de adición o condensación, donde el N nucleofílico del grupo NH_2 de la tiosemicarbazida se une al carbono del grupo carbonilo de la otra molécula (aldehído o cetona), formándose el grupo imino ($\text{C}=\text{N}$) y eliminándose así una molécula de agua [Srinivasan y col., 2013]. Este tipo de reacciones, en las que se produce la formación de iminas o bases de Schiff, son reacciones sencillas que se desarrollan típicamente en un solo paso.

Para este trabajo se sintetizó el ligando orgánico 2-hidroxi-naftaldehído N-feniltiosemicarbazona mediante la reacción de condensación a partir de los reactivos de 2-hidroxi-1-naftaldehído (2-HN) y 4-fenil-3-tiosemicarbazida (FT), la cual se representa en la Figura III.B.1. Así, 0,5 g (2,9 mmol) de 2-HN se añadieron en un matraz de fondo redondo junto con 0,49 g (2,9 mmol) de FT disueltos en 15 mL de dimetilformamida (DMF) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 18 horas, el disolvente fue evaporado mediante destilación a vacío en rotavapor. El producto obtenido fue recrystalizado con etanol caliente y secado al vacío, obteniéndose 0,61 g de producto final (cristales amarillos), con un rendimiento total de la reacción del 65%.

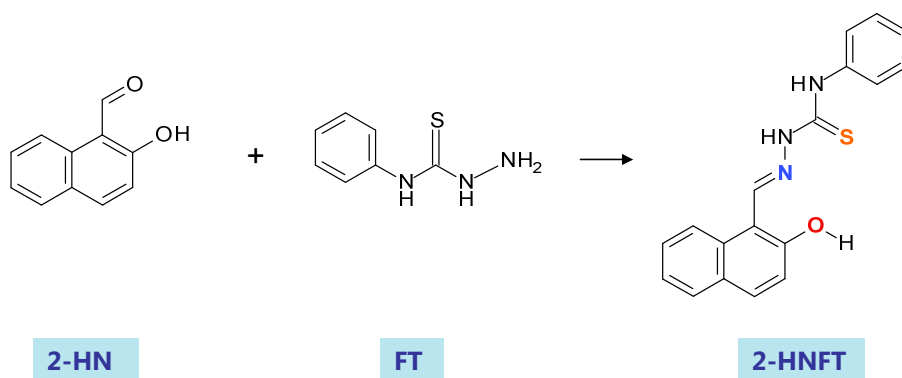


Figura III.B.1. Síntesis del reactivo 2-HNFT (**2-HN**: 2-hidroxinaftaldehído; **FT**: 4-fenil-3-tiosemicarbazida; **2-HNFT**: 2-hidroxinaftaldehído-N-feniltiosemicarbazona)

A continuación, se procedió a la caracterización química de dicho compuesto a partir de los correspondientes espectros de masas, resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) y resonancia magnética nuclear de carbono-13 (¹³C-RMN). En la Figura III.B.2 se muestra el espectro de masas para el compuesto, obteniéndose un peso molecular experimental de 321,1 g mol⁻¹, frente al calculado de 321,4 g mol⁻¹ (fórmula molecular del compuesto 2-HNFT: C₁₈H₁₅N₃SO).

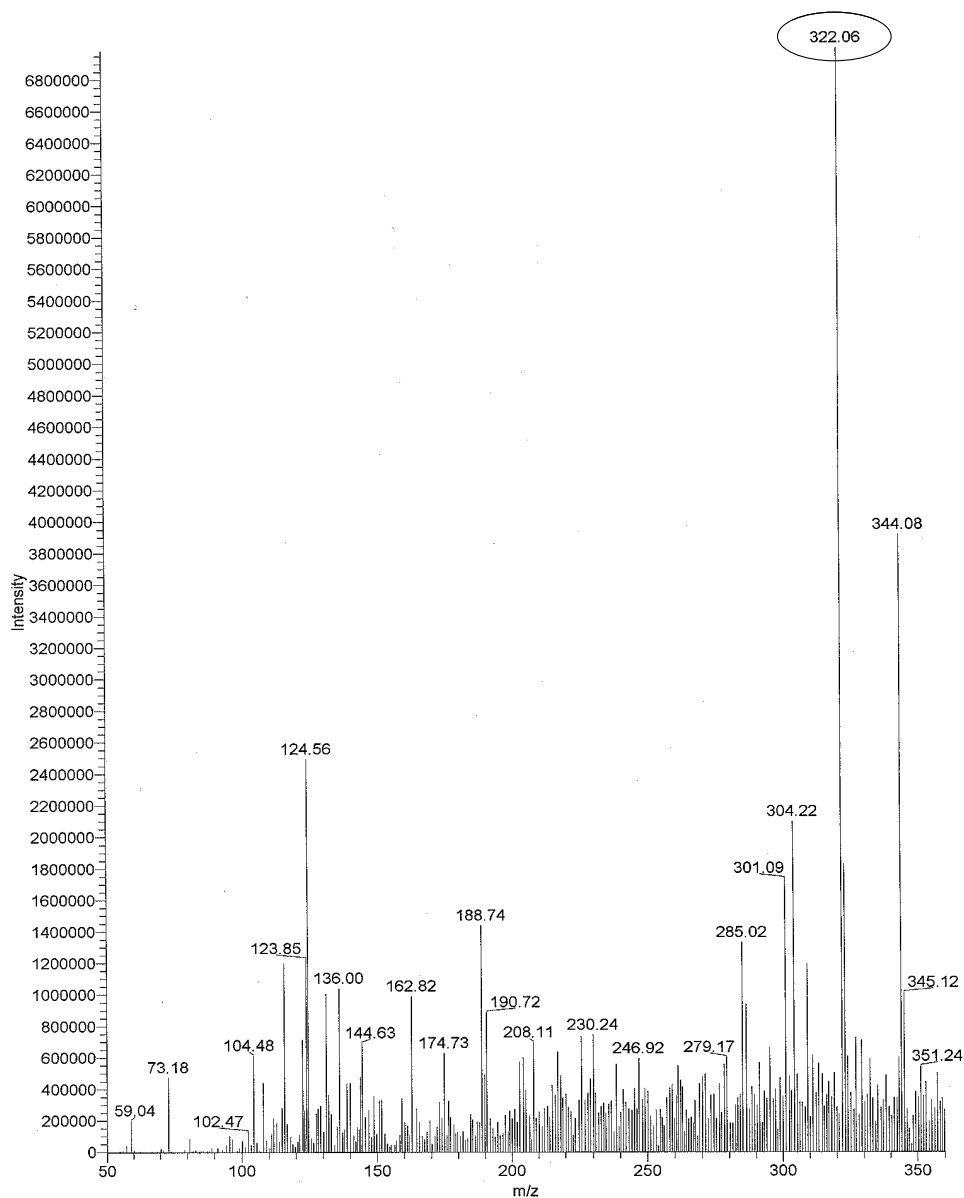


Figura III.B.2. Espectro de masas del compuesto 2-HNFT. Modo ionización: T^+ + c *ESI*
Full *ms* [50,00-360,00]

Una vez confirmado el peso molecular del compuesto mediante el espectro de masas, también se realizaron y estudiaron los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón y de carbono (^1H -RMN y ^{13}C -RMN), mostrados en la Figura III.B.3 y III.B.4.

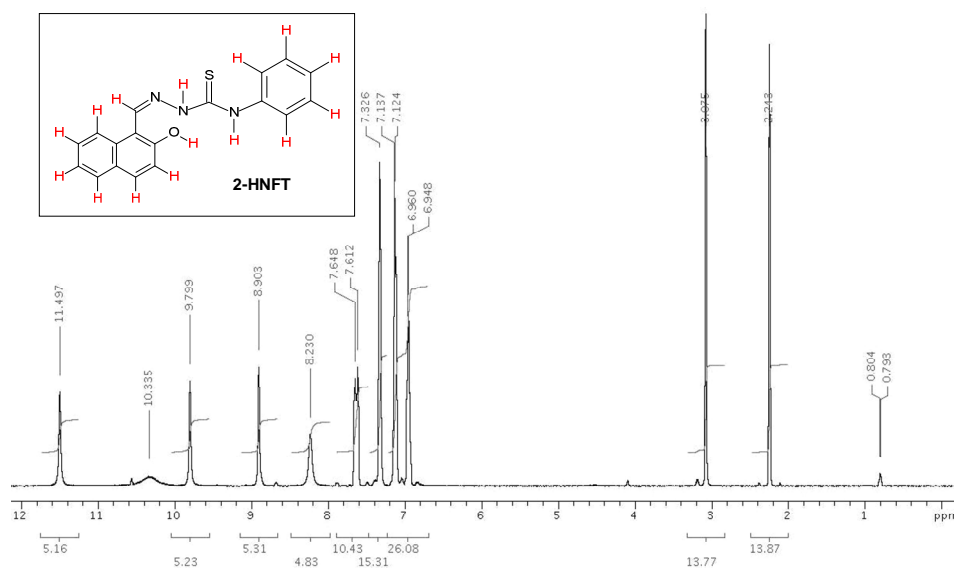


Figura III.B.3. Espectro ¹H-RMN del compuesto 2-HNFT ((500 MHz, DMSO-d₆): 6,95 (2H, m, Ar-H); 7,14 (3H, m, Ar-H); 7,32 (3H, m, Ar-H); 7,61 (2H, m, Ar-H); 8,23 (1H, s, Ar-H); 8,90 (1H, s, CH=N); 9,80 (1H, s, NH); 10,34 (1H, s, OH); 11,50 (1H, s, NH))

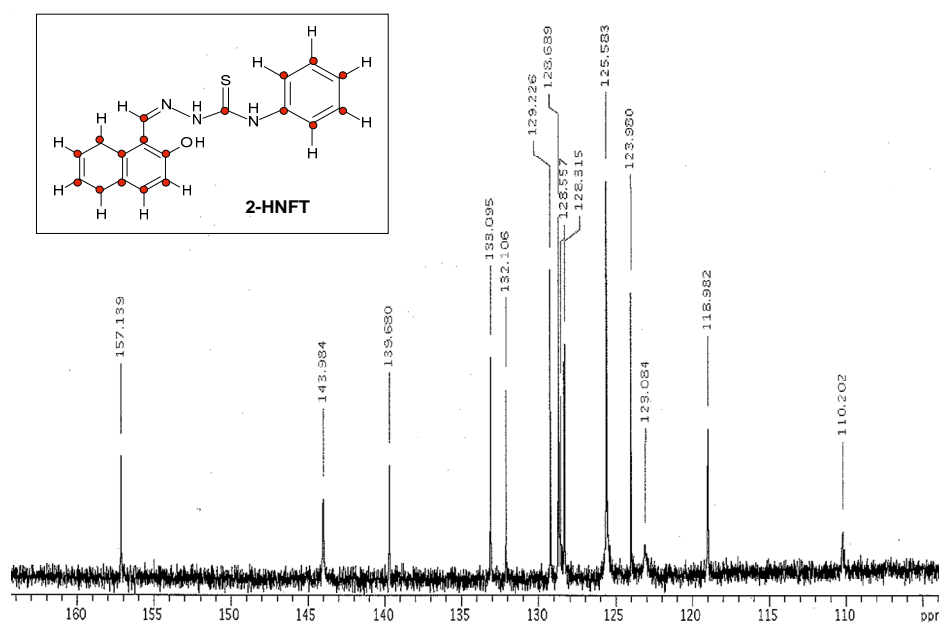


Figura III.B.4. Espectro ¹³C-RMN del compuesto 2-HNFT ((125 MHz DMSO-d₆): 110,2; 119,0; 124,0; 125,6; 128,6; 129,2; 132,1; 133,1; 139,7; 144,0; 157,1)

En base a estos estudios previos de caracterización química, se confirmó que la reacción de formación de la tiosemicarbazona 2-HNFT se había llevado a cabo de manera satisfactoria, formándose el compuesto deseado.

III.B.2.2. Características espectrales del reactivo 2-HNFT en disolución

El reactivo 2-HNFT fue estudiado mediante las técnicas de *espectroscopía de absorción molecular UV-Vis* y de *fluorescencia molecular*, con la finalidad de conocer sus espectros característicos en disolución y observar sus posibles cambios al reaccionar con algunos cationes metálicos.

Para estos estudios, se preparó inicialmente una disolución del sensor de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ en 9:1 (v:v) tetrahidrofurano:agua (THF:H₂O). De esta disolución se tomó un volumen de 1 mL, se añadió 1 mL de disolución reguladora N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano ácido sulfónico (HEPES) a pH 7,4 de concentración 1 mol L^{-1} , y se enrasó la mezcla hasta un volumen final de 10 mL con THF:H₂O (9:1). La concentración del reactivo en la disolución final fue de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ en un medio THF:H₂O (4,26:1). El espectro de absorción UV-Vis de esta disolución de 2-HNFT (Figura III.B.5) mostró una banda ancha de absorción desde 210 nm hasta 450 nm. El perfil de absorción de esta banda permite diferenciar 4 picos principales a longitudes de onda de 210, 245, 320 y 370 nm. Así, los picos a 210 y 245 nm se corresponden con transiciones $\pi-\pi^*$ de los anillos aromáticos; el pico de 320 nm, con transiciones $\pi-\pi^*$ del grupo C=N; mientras que la banda a 370 nm, refleja una transferencia de carga intramolecular debido a la gran conjugación que presenta la molécula [Issa y col., 2008].

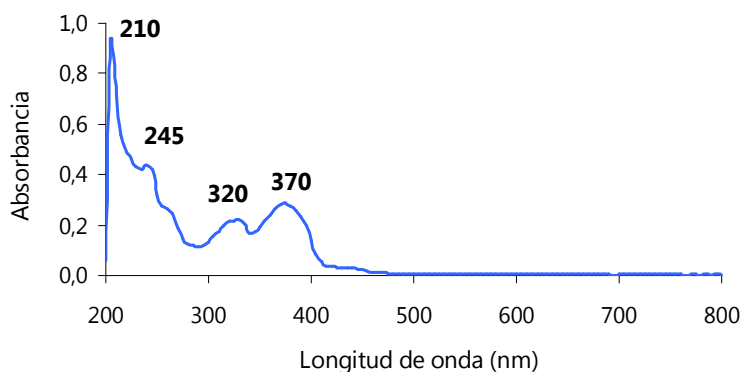


Figura III.B.5. Espectro de absorción molecular UV-Vis del reactivo 2-HNFT en disolución acuo-orgánica THF:H₂O (4,26:1) ajustada a pH 7,4 ([2-HNFT]= $10 \mu\text{mol L}^{-1}$)

Igualmente se realizó el espectro de fluorescencia molecular de la disolución de 2-HNFT, la cual mostró dos principales bandas en la región del visible, con valores de λ_{\max} de emisión a 425 y 485 nm (Figura III.B.6) cuando fue sometida a una excitación de radiación de 375 nm de longitud de onda. Generalmente, la presencia de dos bandas en el espectro de fluorescencia permite la posibilidad de realizar análisis ratiométricos. Esta técnica consiste en comparar la proporción/relación de intensidades de dichas bandas en función de la concentración del analito causante de dichas variaciones de intensidad. Este método de análisis *ratiométrico* es preferido frente al análisis del aumento/disminución de la intensidad de un solo pico a una determinada longitud de onda, dado que éste primero se encuentra libre de errores asociados con la concentración de la molécula sensora, fotodegradación y/o efectos ambientales [Singh y col., 2008].

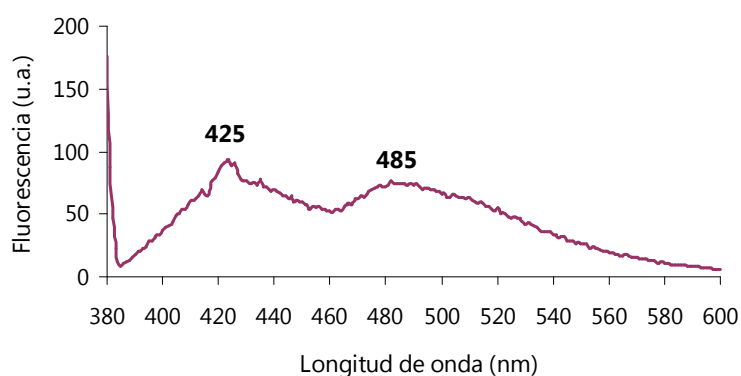


Figura III.B.6. Espectro de fluorescencia del reactivo 2-HNFT en disolución acu-orgánica THF:H₂O (4,26:1) ajustada a pH 7,4 ([2-HNFT]=10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; λ_{exc} =375 nm)

III.B.2.3. Efecto del pH en la fluorescencia de la disolución de sensor 2-HNFT

En primer lugar, se estudió el efecto que tenía el pH de la disolución de 2-HNFT sobre la intensidad de la fluorescencia emitida por la misma. Así, se estudiaron distintos valores de pH (de 2 a 13). Para ello, se prepararon disoluciones del sensor adicionando 10 mL de la disolución inicial de sensor de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ preparada en THF:H₂O (9:1), la cual se enrasó hasta un volumen de 100 mL con el mismo disolvente, es decir, THF:H₂O (9:1). Estas disoluciones fueron vertidas en un matraz erlenmeyer y se sometieron a agitación magnética mientras se ajustaba el pH a cada valor estudiado. Primeramente, se bajó el pH inicial de la disolución desde 3,22 hasta un valor de pH 2 mediante la adición de HCl diluido, a partir del cual se fue aumentando gradualmente

mediante adición de una disolución de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, hasta alcanzar el pH deseado en el rango de 2 a 13. El volumen de disolución acuosa necesario para el ajuste del pH fue despreciable.

En la Figura III.B.7 se muestran los distintos espectros de fluorescencia registrados en función de los valores de pH. Como puede observarse, las curvas permanecieron prácticamente invariables entre los valores de pH 2 y 9, con dos picos de baja intensidad. Las curvas cambiaron de forma y posición para los valores más básicos, donde sólo aparecía un máximo, cada vez de mayor intensidad y desplazado ligeramente hacia longitudes de onda menores. En la Figura III.B.8 se representa la intensidad de emisión a 485 nm frente a los valores de pH estudiados. Esta última gráfica ilustra con mayor claridad que los valores de intensidad permanecieron relativamente constantes de pH 2 a pH 9, pero aumentaron considerablemente para los valores 10-12. Este aumento en la fluorescencia era debido probablemente a la desprotonación del grupo hidroxilo del naftaleno, que se produce a valores de pH más básicos. En base a los resultados, la fluorescencia del sensor 2-HNFT era más estable y constante en el rango de pH 2 a pH 9. Dado que se deseaba su aplicación en muestras de aguas naturales y medios biológicos, se optó por continuar los estudios a valores de pH cercanos a la neutralidad, característicos de estos medios.

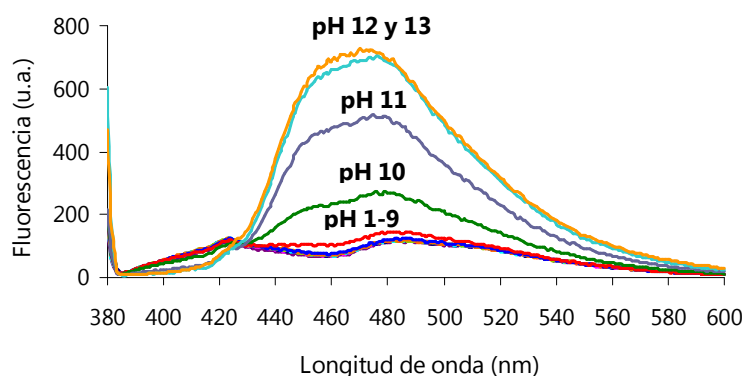


Figura III.B.7. Espectros de fluorescencia del sensor 2-HNFT en disolución acuo-orgánica THF:H₂O (9:1) en función del pH ([2-HNFT]= $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; λ_{exc} =375 nm)

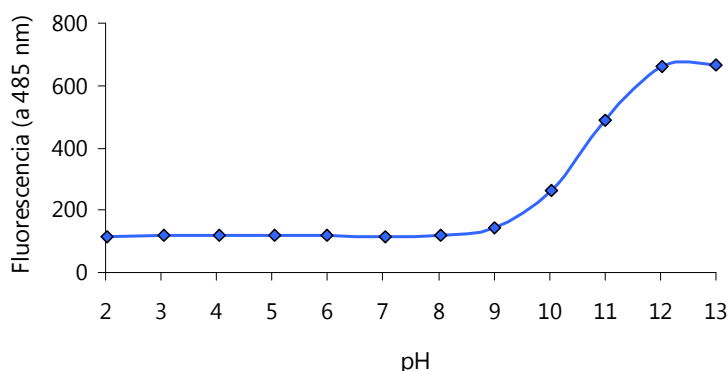


Figura III.B.8. Efecto del pH sobre la fluorescencia del sensor 2-HNFT en disolución acuo-orgánica THF:H₂O (9:1) a 485 nm ([2-HNFT]=10 μmol L⁻¹; λ_{exc}=375 nm)

Con objeto de calcular el valor de pKa correspondiente al grupo hidroxilo de la molécula, se empleó una ecuación derivada de la de Henderson Hasselbalch [Kamila y col., 2007]:

$$\log(I_{\max} - I) / (I - I_{\min}) = -pH + pKa$$

donde I_{\max} es la intensidad de fluorescencia máxima, I_{\min} es la intensidad de fluorescencia mínima e I es la fluorescencia observada para cada valor de pH. Todos estos valores fueron tomados para a longitud de onda λ=485 nm. Posteriormente, se representó $\log(I_{\max}-I)/(I-I_{\min})$ frente al pH, correspondiendo el valor de la ordenada en el origen con el valor de pKa, que fue de 10,62.

III.B.2.4. Estudio del ligando 2-HNFT como molécula sensora para la determinación de cationes metálicos en disolución

La capacidad sensora de la molécula de tiosemicarbazona 2-HNFT fue estudiada frente a diversos cationes de gran interés medioambiental y biológico, tales como Li(I), Na(I), Mg(II), K(I), Ca(II), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Sr(II), Ag(I), Ba(II) y Pb(II). Para ello, se prepararon distintas disoluciones añadiendo, para cada metal, 1 mL de disolución reguladora HEPES a pH 7,4 de concentración 1 mol L⁻¹, 1 mL de disolución inicial de sensor de concentración 100 μmol L⁻¹ en THF:H₂O (9:1) y 1 mL de una disolución acuosa de metal de 250 μmol L⁻¹ (preparada para cada metal a partir de su sal clorada en estado sólido). Finalmente, se enrasó hasta un volumen de 10 mL con THF:H₂O (9:1). La concentración final de sensor en la disolución fue de 10 μmol L⁻¹ y de

ión metálico de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ en un medio acuo-orgánico THF:H₂O (2,57:1). Después de preparar estas disoluciones, se registraron los espectros de fluorescencia y absorción molecular UV-Visible, para cada metal. Todas las disoluciones mostraron un color amarillo pálido, excepto en el caso del Cu(II) que fue más intenso, como puede apreciarse en el espectro de absorción UV-Vis, en la Figura III.B.9 (banda de absorción a 425 nm).

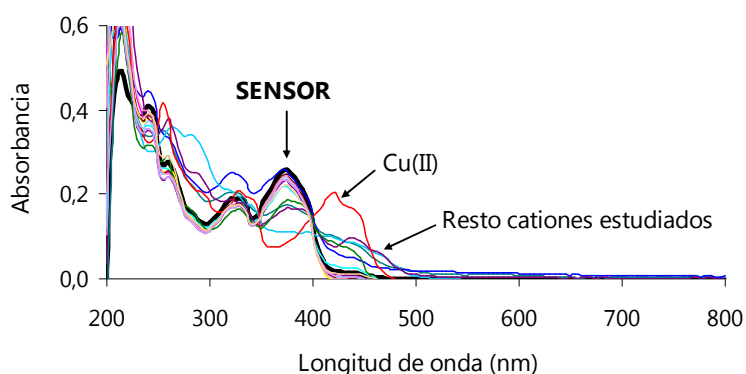


Figura III.B.9. Espectros de absorción molecular UV-Vis del reactivo 2-HNFT en disolución acuo-orgánica THF:H₂O (2,57:1) a pH 7,4 en ausencia y presencia de los cationes metálicos estudiados (Li(I), Na(I), Mg(II), K(I), Ca(II), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Sr(II), Ag(I), Ba(II) y Pb(II)) ([2-HNFT]= $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ y [Metal]= $25 \mu\text{mol L}^{-1}$)

Al registrar los distintos espectros de fluorescencia, se observó que la adición de los cationes Li(I), Na(I), Mg(II), K(I), Ca(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Sr(II), Ag(I) y Ba(II) no causaron cambios notables respecto al espectro de fluorescencia inicial del sensor. Por otro lado, la adición de Pb(II) causó un pequeño aumento en ambas bandas, mientras que la de Cu(II) provocó una notable disminución de la banda de 485 nm. Sin embargo, las intensidades de la fluorescencia de los dos picos del sensor sufrieron un incremento muy significativo cuando se añadió Fe(III) a la disolución (Figura III.B.10).

Tal y como puede observarse, la adición de Fe(III) supuso un aumento bastante significativo en la intensidad de la fluorescencia de ambas bandas, con un aumento del 104% en el máximo a 425 nm y del 194% en el pico de 485 nm, con respecto al espectro del sensor en ausencia de ión metálico.

El gran aumento de fluorescencia tras la adición de Fe(III) se debe a la formación del complejo entre el metal y la tiosemicarbazona tridentada, gracias a sus posiciones donadoras: el par de electrones donados por el átomo de O del hidróxido, el par de electrones del N del grupo imino y el par perteneciente al S (Figura III.B.11) [Antholine

y col., 1977]. Todos ellos se unen fuertemente al Fe(III), de manera que este enlace previene la rápida isomerización del grupo C=N, la cual tendería a producirse en ausencia del ion metálico, dando lugar a una emisión no radiante desde el estado excitado al fundamental [Bhardwaj y col., 2008]. Son poco comunes los ejemplos de sensores de fluorescencia del tipo “Off-On” para el caso del Fe(III), ya que habitualmente, y debido a la naturaleza redox del metal, se produce la disminución de la fluorescencia del fluoróforo orgánico mediante procesos de transferencia electrónica cuando éste se encuentra en el entorno del fluoróforo [Fabrizzi y Poggi, 1995; Singh y col., 2009b; Singh y col., 2009c]. Así, en este caso, el aumento de la fluorescencia que tiene lugar como resultado de la inhibición de los procesos de isomerización del grupo C=N, es mayor que la capacidad de atenuación del Fe(III), y se observa, por tanto, una respuesta de tipo “Off-On”. También se puede atribuir a un aumento en la rigidez de la molécula.

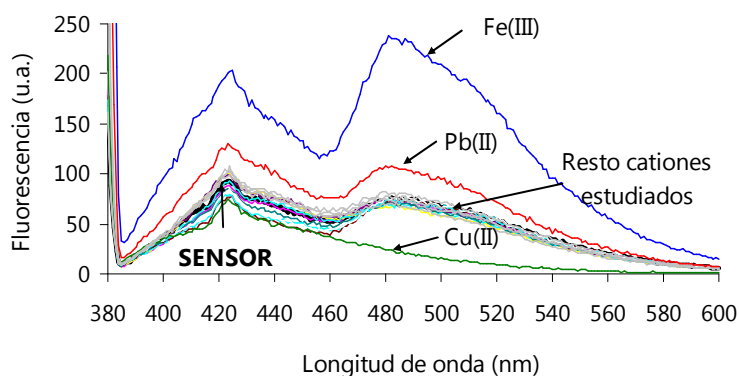


Figura III.B.10. Espectros de fluorescencia del reactivo 2-HNFT en disolución acuo-orgánica THF:H₂O (2,57:1) a pH 7,4 en ausencia y presencia de los cationes metálicos estudiados (Li(I), Na(I), Mg(II), K(I), Ca(II), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Sr(II), Ag(I), Ba(II) y Pb(II)) ([2-HNFT]=10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Metal]=25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; λ_{exc} = 375 nm)

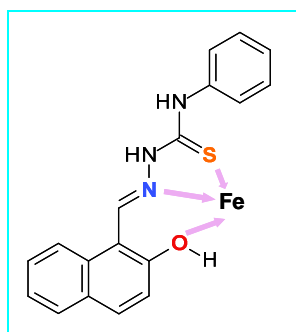


Figura III.B.11. Posiciones de coordinación en la formación del complejo 2-HNFT-Fe(III)

A la vista de los resultados obtenidos, se decidió estudiar y optimizar el sistema sensor 2-HNFT para la determinación del catión Fe(III) en disolución.

III.B.2.5. Determinación de la estequiometría del complejo 2-HNFT-Fe(III)

La estequiometría del complejo formado entre el sensor 2-HNFT y el catión Fe(III) se determinó mediante el **método de Job** o **método de las variaciones continuas**. Este método consiste en la medición de la señal espectrofotométrica del complejo metal-ligando en una serie de disoluciones en las que se van mezclando sistemáticamente en distintas proporciones disoluciones de catión y reactivo, de igual concentración analítica, de forma que el volumen total y los moles totales de reactivos de todas las mezclas sea constante [Job, 1928; Kirkbright y col., 1965].

Para la aplicación de este método se prepararon una serie de disoluciones que contenían: 1 mL de disolución reguladora HEPES a pH 7,4 de concentración 1 mol L^{-1} , un determinado volumen de disolución de sensor en medio acuo-orgánico (THF:H₂O (9:1)) y un determinado volumen de disolución acuosa de Fe(III), ambas de concentración inicial de $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (Tabla III.B.1). Con el fin de tener la misma cantidad de agua y THF en todas las disoluciones, se complementaron las muestras con diferente volumen de agua y, finalmente, se enrasaron hasta un volumen final de 10 mL, con una disolución de THF:H₂O (9:1). La proporción de THF:H₂O final en todas las disoluciones fue de 2,57:1. Todas las determinaciones se realizaron respecto a un blanco preparado de la misma manera que las disoluciones de estudio, pero sin contener metal ni reactivo. Las medidas de fluorescencia se realizaron a una longitud de onda de excitación de 375 nm y se representó la intensidad ratiométrica (I_{485}/I_{425}) de cada determinación, frente a la fracción molar de Fe(III). Como las concentraciones de catión y ligando de partida son las mismas, la fracción molar coincide con la fracción de volumen; es decir, $V_M/(V_M+V_L)$, donde V_M es el volumen de la disolución de catión y V_L el del ligando.

Representando I_{485}/I_{425} frente a la fracción molar del Fe(III), se observó un aumento de la fluorescencia ratiométrica en las primeras disoluciones, para posteriormente comenzar un descenso, obteniéndose el punto de corte de ambas rectas a una fracción molar de Fe(III) de 0,5, lo cual indicaba una estequiometría catión/ligando de 1:1 (Figura III.B.12).

Tabla III.B.1. Composición de las disoluciones empleadas en la determinación estequiométrica del complejo Fe(III)-2-HNFT por el método de Job

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V _A (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V _B (mL)	0	0,15	0,2	0,3	0,5	0,65	0,75	0,8	0,875	1
V _C (mL)	1	0,85	0,8	0,7	0,5	0,35	0,25	0,2	0,125	0
V _{agua} (mL)	1	0,85	0,8	0,7	0,5	0,35	0,25	0,2	0,125	0
χ_{Fe}	0	0,15	0,2	0,3	0,5	0,65	0,75	0,8	0,875	1
I ₄₈₅ /I ₄₂₅	1,534	2,416	2,536	3,269	3,497	2,055	1,087	1,032	0,838	0,105

Volumen final de cada muestra: 10 mL, obtenido mediante enrase con THF:H₂O (9:1)

A: Disolución reguladora HEPES 1 mol L⁻¹ a pH 7,4

B: Disolución acuosa de Fe(III) 1,5·10⁻³ mol L⁻¹

C: Disolución de 2-HNFT 1,5·10⁻³ mol L⁻¹ en THF:H₂O (9:1)

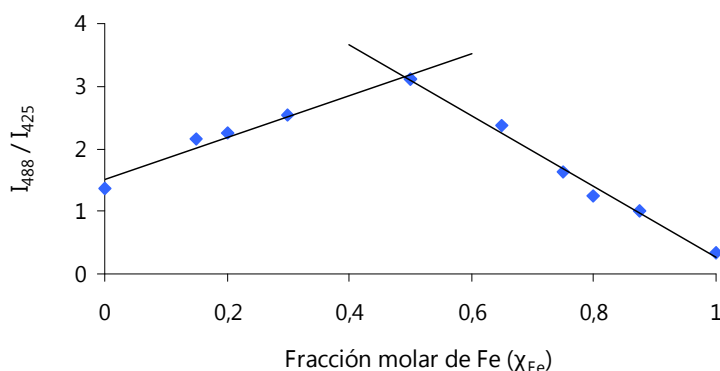


Figura III.B.12. Aplicación del método de las variaciones continuas para la determinación de la estequiometría del complejo 2-HNFT-Fe(III) empleando la intensidad de fluorescencia ratiométrica (condiciones en la Tabla III.B.1)

III.B.2.6. Rango de aplicabilidad del sensor 2-HNFT para la determinación de Fe (III) en disolución acuosa

Con objeto de evaluar la respuesta del sensor en función de la concentración de Fe(III) en disolución, se adicionaron diferentes concentraciones de metal siguiendo el siguiente procedimiento: en matraces aforados de 10 mL se adicionaron 1 mL de disolución reguladora HEPES a pH 7,4 de concentración 1 mol L⁻¹, 1 mL de disolución

de sensor 2-HNFT de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ preparada en THF:H₂O (9:1) y una alícuota de disolución acuosa patrón de Fe(III), según la concentración de metal a adicionar. Los matraces fueron enrasados con THF:H₂O (9:1). Como el volumen de la disolución acuosa de Fe(III) fue variable en función de la concentración estudiada, se complementaron las muestras con diferente volumen de agua hasta obtener en todas las muestras un volumen total de agua de 2,8 mL. Así, la relación volumen de THF:volumen de agua final para todas las disoluciones fue de THF:H₂O = 2,57:1. En la Figura III.B.13 se han recogido los diferentes espectros de emisión de fluorescencia del sensor 2-HNFT obtenidos para un rango de concentración de Fe(III) adicionada de 0 a $37,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, siendo la longitud de onda de excitación de 375 nm. Se observa como los dos máximos de emisión a 425 y 485 nm se incrementaron con la concentración de ion metálico.

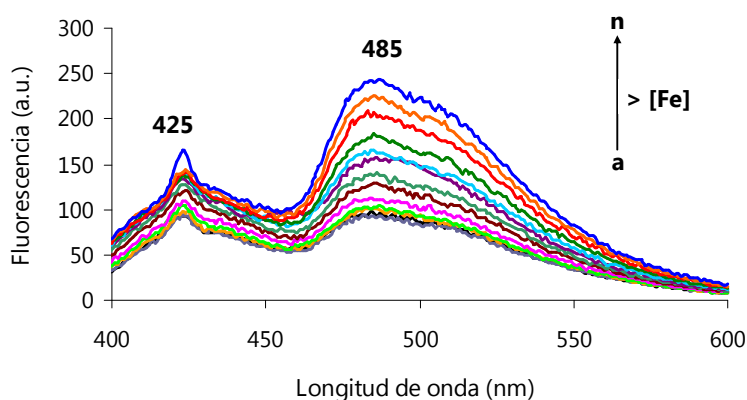


Figura III.B.13. Espectros de fluorescencia del sensor 2-HNFT en disolución acuorgánica THF:H₂O (2,57:1) a pH 7,4 en presencia de diferentes concentraciones de Fe(III) ([2-HNFT]= $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; [Fe(III)] ($\mu\text{mol L}^{-1}$): (a) 0; (b) 3,7; (c) 7,5; (d) 12,5; (e) 15; (f) 17,5; (g) 20; (h) 22,5; (i) 25; (j) 27,5; (k) 30; (l) 32,5; (m) 35; (n) 37,5; λ_{exc} =375 nm)

A partir de los datos de los espectros de fluorescencia se representó la intensidad ratiométrica I_{485}/I_{425} calculada como la relación entre las intensidades obtenidas a 485 y 425 nm, frente a la concentración de Fe(III) (Figura III.B.14). Se observó una buena linealidad en el intervalo **15-37,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$** para la concentración de Fe(III), siendo por tanto muy adecuado el uso de este sensor ratiométrico fluorescente de tipo "Off-On" en la determinación del ión Fe(III) para ese rango de concentración.

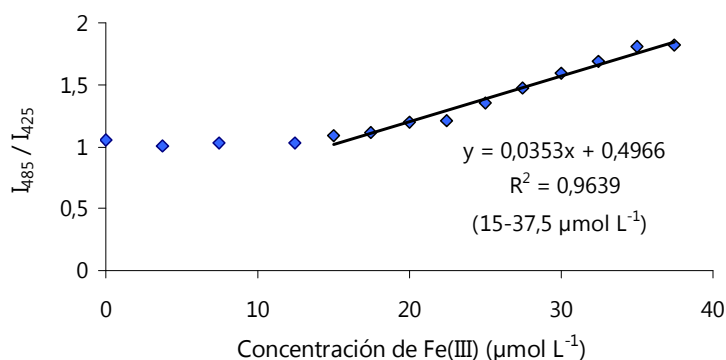


Figura III.B.14. Representación de la intensidad de fluorescencia ratiométrica I_{485}/I_{425} frente a diferentes concentraciones de Fe(III) en disolución acuo-orgánica THF: H_2O (2,57:1) a pH 7,4 ($[\text{2-HNFT}] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{Fe(III)}]$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$): (a) 0; (b) 3,7; (c) 7,5; (d) 12,5; (e) 15; (f) 17,5; (g) 20; (h) 22,5; (i) 25; (j) 27,5; (k) 30; (l) 32,5; (m) 35; (n) 37,5; $\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$)

Para el cálculo de la constante de formación del complejo formado ($\log \beta$), se recurrió a la ecuación *modificada de Henderson-Hasselbalch* (empleada en el cálculo de la constante de disociación pK_a), donde se sustituye $-\text{pH}$ por $-\log[\text{catión}]$ y pK_a por $\log \beta$ [de Silva y Gunaratne, 1990; de Silva y col., 1995]:

$$\log(I_{\text{max}} - I) / (I - I_{\text{min}}) = \log[\text{catión}] + \log \beta$$

donde I_{max} es la intensidad de fluorescencia máxima, I_{min} es la intensidad de fluorescencia mínima e I es la fluorescencia obtenida tras cada adición de Fe(III) . Todos estos valores fueron tomados a la longitud de onda $\lambda = 485 \text{ nm}$. Posteriormente, se representó $\log(I_{\text{max}} - I) / (I - I_{\text{min}})$ frente a $\log [\text{Fe(III)}]$. Finalmente se obtuvo un valor para $\log \beta$ de 4,56, siendo el valor de la constante $\beta = 10^{4,56} = 3,631 \cdot 10^4$.

III.B.2.7. Selectividad del sensor 2-HNFT

Finalmente, se evaluó la selectividad o especificidad del sensor 2-HNFT por el ión Fe(III), evaluando los cambios en la fluorescencia del sensor causados por otros cationes metálicos como Li(I), Na(I), Mg(II), K(I), Ca(II), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Sr(II), Ag(I), Ba(II) y Pb(II). Para ello, se prepararon distintas disoluciones acuo-orgánicas con una concentración final de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 2-HNFT y $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metal. Para preparar cada disolución se tomaron 1 mL de disolución reguladora HEPES a pH 7,4 de concentración 1 mol L^{-1} , 1 mL de disolución de sensor de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ preparada en THF:H₂O (9:1), 1 mL de disolución acuosa patrón de metal de $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ y, por último, se enrasó hasta un volumen final de 10 mL con THF:H₂O (9:1). La relación volumen:volumen de THF:H₂O en la disolución fue de 2,57:1.

En la Figura III.B.15 se muestra la comparación de la variación de la fluorescencia inicial del sensor causada por todos los cationes metálicos estudiados, incluyendo también la respuesta del sensor en presencia de Fe(III). Así, se ha representado el cociente I/I_0 , donde I es la intensidad tras la adición del catión metálico e I_0 representa la intensidad inicial del sensor en ausencia de metal (ambas a 485 nm). Si se compara el efecto producido por el Fe(III) frente al resto de iones metálicos, puede observarse que la respuesta del sensor es significativa únicamente para el ion Fe(III), con un cociente de 2,5. El resto de cationes produjeron un cociente muy próximo a 1, indicando que la intensidad de fluorescencia del sensor no cambia en presencia o ausencia del ión metálico estudiado, a excepción del Cu(II) que mostró una disminución notable de fluorescencia bajo las mismas condiciones operativas, y el Pb(II) que dio lugar a una subida pequeña de la fluorescencia.

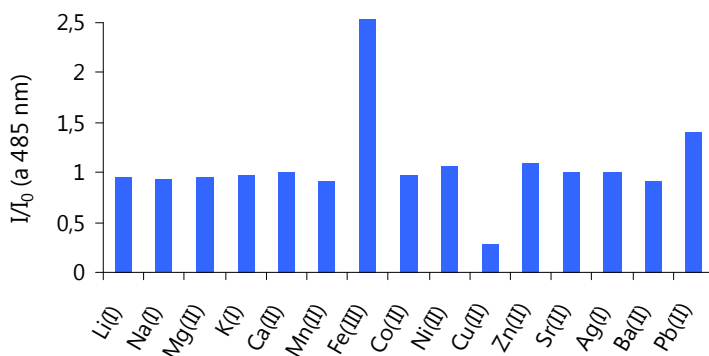


Figura III.B.15. Respuesta del sensor de fluorescencia 2-HNFT a la presencia de Fe(III) y otros iones metálicos en disolución acuo-orgánica THF:H₂O (2,57:1) a pH 7,4 ([2-HNFT]= $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; [Metal]= $25 \mu\text{mol L}^{-1}$; λ_{exc} = 375 nm)

III.B.3. Sensor b: 2,6-bis(N-(2-hidroxi-1-naftilmetilen)-diamino)-piridina (2,6-HNDP)

III.B.3.1. Síntesis y caracterización química

El compuesto 2,6-bis(N-(2-hidroxi-1-naftilmetilen)-diamino)-piridina (2,6-HNDP) fue también sintetizado y estudiado como posible molécula sensora fluorescente para la determinación de cationes metálicos en disolución. Esta imina o base de Schiff (caracterizada por la presencia de un doble enlace carbono-nitrógeno) contiene diversos átomos donadores de electrones (3 N y 2 O). El reactivo posee dos grupos funcionales de 2-hidroxinaftaleno unidos mediante enlaces C=N a una molécula de piridina. Por otro lado, se ha demostrado que un gran número de sideróforos o agentes quelatantes de Fe suelen presentar un sustituyente fenol adyacente a un átomo de N con hibridación sp^2 , como en el caso del compuesto 2,6-HNDP [Abergel y Raymond, 2006; Jurchen y Raymond, 2006; Bergeron y col., 2003]. Por este motivo y a priori, se pudo considerar el empleo de esta molécula como posible sensor para la detección de cationes Fe(III) en disolución.

Al igual que el compuesto anterior, su síntesis es relativamente sencilla, pues su formación es posible mediante una reacción de condensación en un único paso, entre el N nucleofílico de un grupo amino y el O del grupo carbonilo de un aldehído o cetona. Así, se partió nuevamente del reactivo 2-hidroxi-1-naftaldehído (2-HN) y de la 2,6-diaminopiridina (2,6-DP), representados en la Figura III.B.16. Se añadieron en un matraz de fondo redondo 1,66 g de 2-HN (9,65 mmol) y 0,5 g de 2,6-DP (4,58 mmol), en un volumen de 15 mL de dimetilformamida (DMF). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas, para posteriormente evaporar el disolvente mediante destilación a vacío en rotavapor. Para purificar este producto, se recristalizó con etanol caliente y, posteriormente, se filtró y secó a vacío, obteniéndose finalmente 1,24 g de el compuesto 2,6-HNDP, de color naranja intenso, con un rendimiento de la síntesis de aproximadamente un 65%.

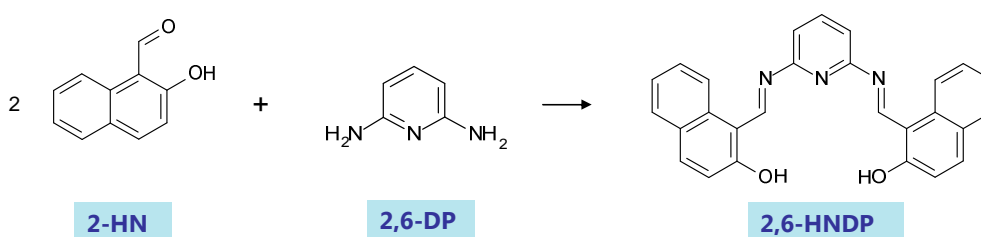


Figura III.B.16. Síntesis del reactivo 2,6-HNDP (**2-HN**: 2-hidroxinaftaldehído; **2,6-DP**: 2,6-diaminopiridina; **2,6-HNDP**: 2,6-bis(N-(2-hidroxi-1-naftilmetilen)-diamino)-piridina)

A continuación, se procedió a la caracterización química de dicho compuesto a partir de su espectro de masas, así como de resonancia magnética nuclear ^1H -RMN y ^{13}C -RMN. En la Figura III.B.17 se muestra el espectro de masas para el sensor sintetizado, obteniéndose un peso molecular experimental de $417,3 \text{ g mol}^{-1}$, frente al calculado de $417,5 \text{ g mol}^{-1}$ (Fórmula molecular compuesto: $\text{C}_{27}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$).

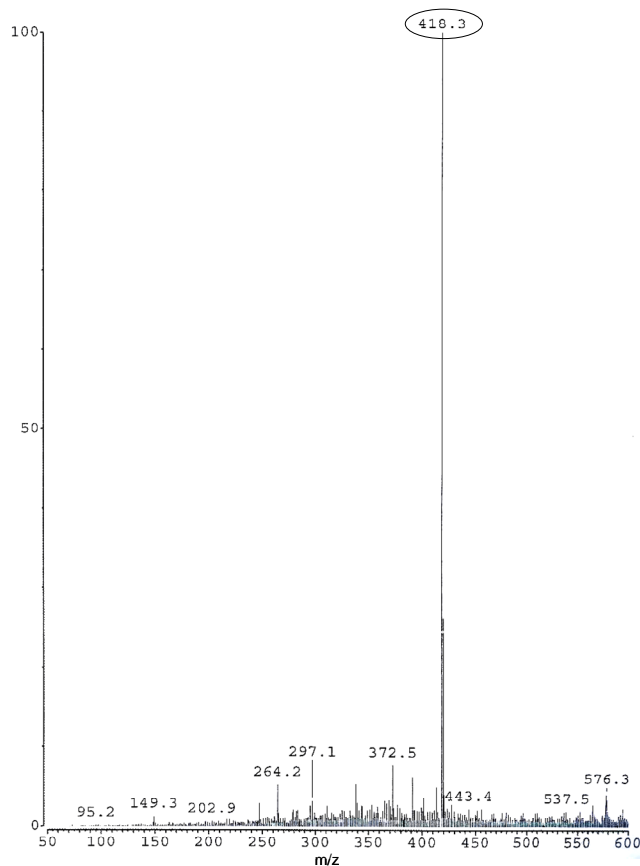


Figure III.B.17. Espectro de masas del compuesto 2,6-HNDP.
Modo ionización: $T: + c$ ESI Full ms [50,00-600,00]

Una vez confirmado el peso molecular del compuesto mediante el espectro de masas, también se realizaron y analizaron los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón (^1H -RMN) y de carbono (^{13}C -RMN), mostrados en la Figura III.B.18 y III.B.19. Conviene resaltar que en cualquier espectro de ^1H -RMN, las señales correspondientes a los H unidos a los O en los grupos hidroxilo (-OH) suelen ser muy débiles, siendo imperceptibles en este caso. Una de las causas podría ser el elevado ruido de fondo obtenido en esta determinación.

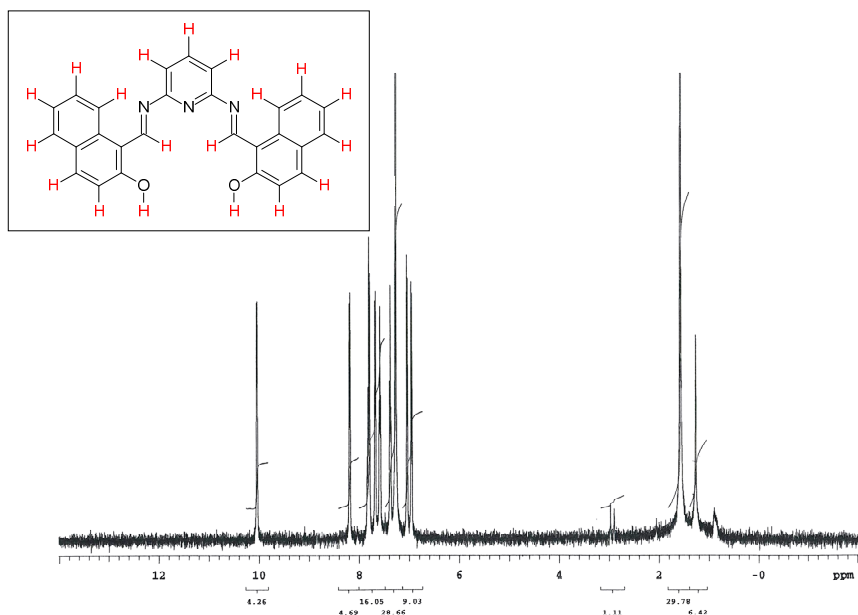


Figura III.B.18. Espectro ^1H -RMN del compuesto 2,6-HNDP ((500 MHz, DMSO-d_6): 6,96 (2H, d, Pir-H); 7,05 (2H, d, Naft-H); 7,38 (2H, dd, Naft-H); 7,59 (2H, dd, Naft-H); 7,68 (2H, d, Naft-H); 7,82 (3H, m, Pir-H, Naft-H); 8,19 (2H, d, Naft-H); 10,04 (2H, d, CH=N))

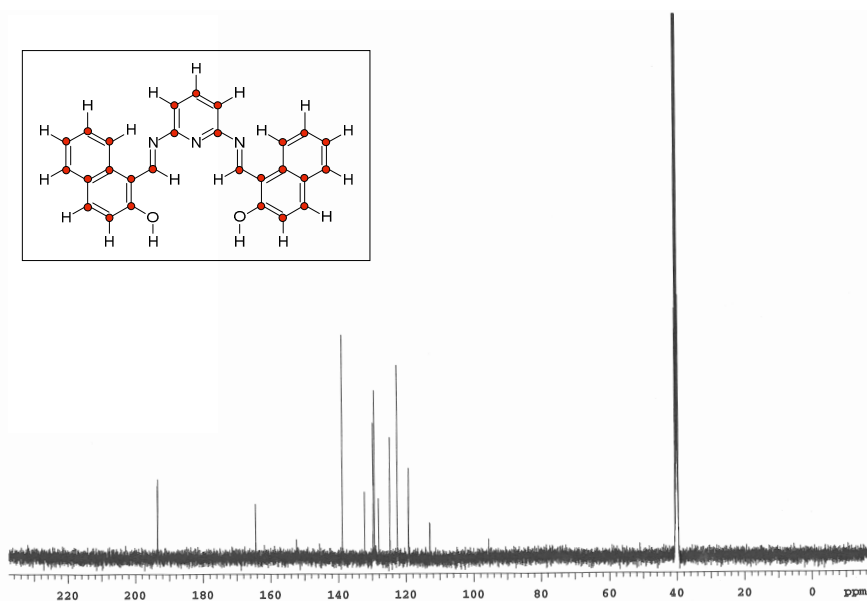


Figura III.B.19. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto 2,6-HNDP ((125 MHz DMSO-d_6): 112,9; 119,2; 122,5; 124,7; 128,0; 129,3; 129,7; 132,2; 138,8; 164,3; 193,4)

Tras el estudio de todos los espectros registrados, se confirmó que la reacción de síntesis del compuesto 2,6-HNDP había tenido lugar de modo satisfactorio, obteniéndose la estructura química deseada.

III.B.3.2. Características espectrales del reactivo 2,6-HNDP en disolución

Las características espectrales del compuesto sintetizado fueron estudiadas mediante las técnicas de *espectroscopía de absorción molecular UV-Vis* y de *fluorescencia molecular*. A partir de este estudio óptico inicial fue posible conocer los picos de absorción y emisión característicos del compuesto, para su estudio y aplicación como sensor óptico fluorescente para la determinación de algunos cationes metálicos en disolución.

Para la realización de dichos espectros, se preparó una disolución inicial de sensor de concentración $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, empleándose como disolvente una mezcla de tetrahidrofurano:agua (THF:H₂O) (9:1). A continuación, en un matraz aforado se adicionaron 1 mL de disolución reguladora HEPES a pH 7,0 de concentración 1 mol L^{-1} , y 1 mL de la disolución inicial del sensor. Esta mezcla de dos volúmenes se enrasó hasta un volumen de 10 mL con THF:H₂O (9:1). De este modo, se obtuvo una concentración de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de sensor 2,6-HNDP en un medio acuo-orgánico compuesto por THF:H₂O (4,26:1). Tras efectuarse el registro del espectro de absorción molecular de este compuesto en disolución, se observaron en su espectro dos bandas principales a longitudes de onda (λ_{max}) de 280 y 475 nm, reflejando la existencia de los grupos cromóforos correspondientes a la piridina y el naftaleno, respectivamente (Figura III.B.20).

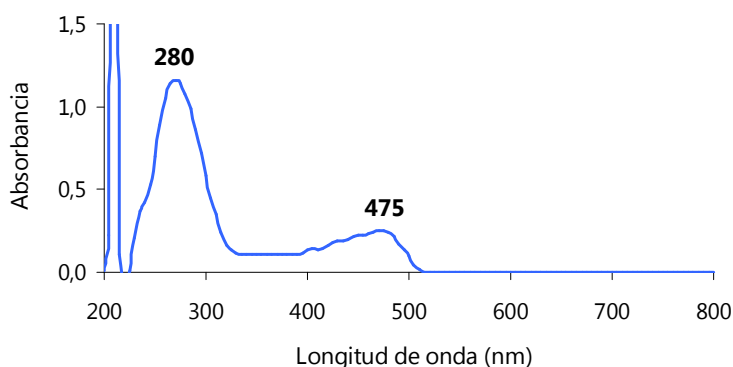


Figura III.B.20. Espectro de absorción molecular UV-Vis del reactivo 2,6-HNDP en disolución acuo-orgánica THF:H₂O (4,26:1) ajustada a pH 7,0 ([2,6-HNDP]= $10 \mu\text{mol L}^{-1}$)

Seguidamente, se realizó el espectro de fluorescencia de la disolución de sensor en medio acuo-orgánico, mostrando una única banda a 507 nm, tras ser excitada la disolución a 475 nm (Figura III.B.21).

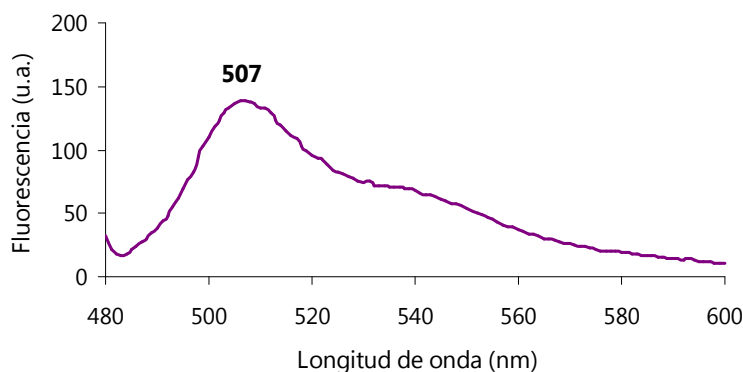


Figura III.B.21. Espectro de fluorescencia del reactivo 2,6-HNDP en disolución acuo-orgánica THF:H₂O (4,26:1) ajustada a pH 7,0 ([2,6-HNDP]=10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; λ_{exc} =475 nm)

III.B.3.3. Efecto del pH en la fluorescencia de la disolución de sensor 2,6-HNDP

Se realizó el estudio de la influencia del pH de la disolución en la intensidad de fluorescencia emitida por el sensor 2,6-HNDP. Para ello, se evaluó un amplio rango de valores de pH (2-13). Se prepararon disoluciones del sensor adicionando 10 mL de la disolución inicial del sensor de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ preparada en THF:H₂O (9:1) en un matraz, y enrasando hasta un volumen de 100 mL mediante la misma mezcla disolvente, es decir, THF:H₂O (9:1). Estas disoluciones fueron vertidas en un matraz erlenmeyer y se sometieron a agitación magnética mientras se ajustaba el pH a cada valor estudiado. En primer lugar, se bajó el pH inicial de la disolución desde 6,96 hasta un valor de pH 2, empleando para ello pequeños volúmenes de HCl diluido, a partir del cual se fue aumentando gradualmente el pH mediante adición de disolución de NaOH 0,5 mol L^{-1} , hasta alcanzar el pH deseado en el rango de 2 a 13. El volumen de disolución acuosa necesario para el ajuste del pH fue despreciable.

En la Figura III.B.22 se representan los distintos espectros de fluorescencia obtenidos para cada valor de pH estudiado, observándose que son prácticamente similares para valores comprendidos entre 2-11. No obstante, se registró una disminución en la intensidad de fluorescencia para los valores más básicos (pH 12 y 13). En la Figura III.B.23 se registró la variación de la intensidad de fluorescencia a la

longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{max}}=507 \text{ nm}$) con el pH, donde se aprecia más claramente la disminución progresiva de la fluorescencia a medida que aumenta el pH, sobre todo a valores de pH 12 y 13, probablemente debido a que la molécula sufre un proceso de desprotonación de los grupos -OH, que conlleva esta atenuación de la intensidad de fluorescencia. En base a estos resultados y tratándose de una molécula sensora enfocada a su aplicación en aguas naturales y medios biológicos, se continuaron los estudios utilizando un valor de pH cercano a la neutralidad.

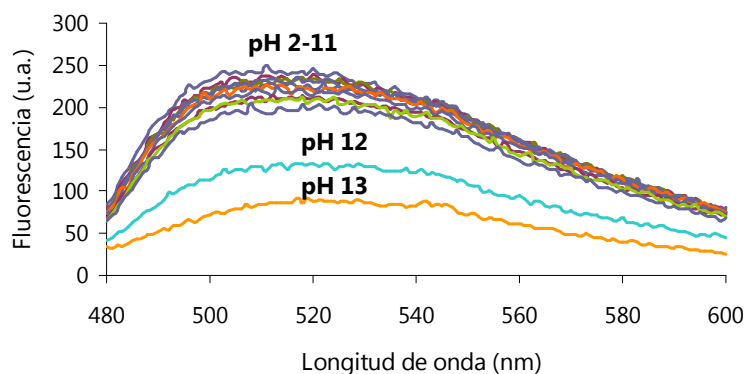


Figura III.B.22. Espectros de fluorescencia del sensor 2,6-HNDP en disolución acuo-orgánica THF:H₂O (9:1) en función del pH ([2,6-HNDP]=10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; $\lambda_{\text{exc}}=475 \text{ nm}$)

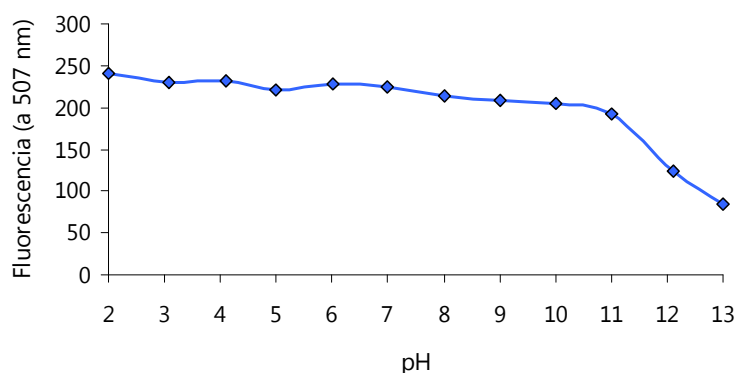


Figura III.B.23. Efecto del pH sobre la fluorescencia del sensor 2,6-HNDP en disolución acuo-orgánica THF:H₂O (9:1) a 507 nm ([2,6-HNDP]=10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; $\lambda_{\text{exc}}=475 \text{ nm}$)

III.B.3.4. Estudio del ligando 2,6-HNDP como molécula sensora para la determinación de cationes metálicos en disolución

La capacidad sensora de la molécula de 2,6-HNDP fue estudiada para ser aplicada en la determinación de cationes metálicos en disolución. Para ello, se estudió la respuesta fluorimétrica del reactivo 2,6-HNDP frente a un amplio rango de cationes de gran interés medioambiental y biológico, tales como Li(I), Na(I), Mg(II), K(I), Ca(II), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Sr(II), Ag(I), Ba(II) y Pb(II). Se prepararon las distintas disoluciones añadiendo, para cada metal, 1 mL de disolución reguladora HEPES a pH 7,0 de concentración 1 mol L^{-1} , 1 mL de disolución inicial de sensor de concentración $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ en THF:H₂O (9:1) y 1 mL de una disolución acuosa de metal de $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (preparada para cada metal a partir de su sal clorada en estado sólido). Finalmente, se enrasó hasta un volumen de 10 mL con THF:H₂O (9:1). La concentración final de sensor en la disolución fue de $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ y de ión metálico de $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para los diferentes iones metálicos en un medio acuo-orgánico THF:H₂O (2,57:1). Después de preparar estas disoluciones, se registraron los espectros de fluorescencia y de absorción molecular UV-Vis para cada metal (Figura III.B.24 A). La presencia de Fe(III) provocó la desaparición de la banda de absorción molecular a 475 nm que mostraba inicialmente la disolución del sensor, desplazándose dicha banda de absorción a una longitud de onda de 325 nm (desplazamiento hacia el azul) (Figura III.B.24 B). Este efecto pudo observarse a simple vista mediante un cambio de color en la disolución, pasando de amarilla a incolora al desaparecer el pico de absorción del sensor en la región del visible (475 nm) (Figura III.B.25). Por otro lado, se registró una pequeña disminución para la misma banda de absorción del sensor cuando éste se encontraba en presencia del Cu(II).

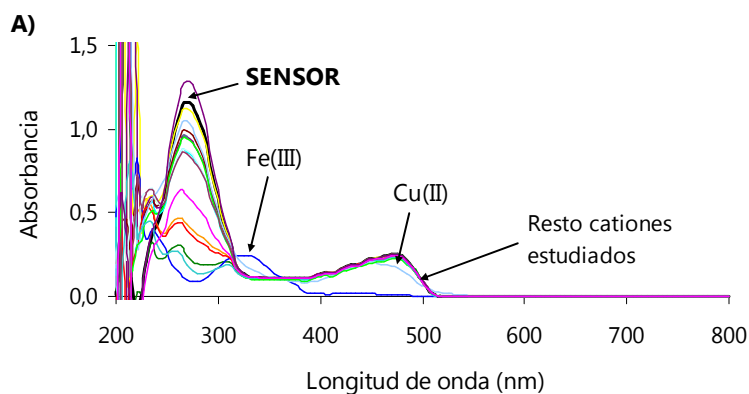


Figura III.B.24. A) Espectros de absorción molecular UV-Vis del reactivo 2,6-HNDP en disolución acuo-orgánica THF:H₂O (2,57:1) a pH 7,0 en ausencia y presencia de los cationes metálicos estudiados (Li(I), Na(I), Mg(II), K(I), Ca(II), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Sr(II), Ag(I), Ba(II) y Pb(II)) ([2,6-HNDP]= $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ y [Metal]= $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$)

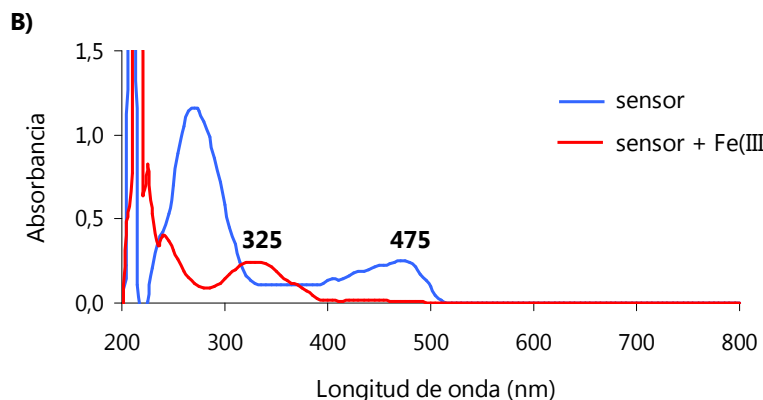


Figura III.B.24. B) Detalle del espectro de absorción molecular UV-Vis del reactivo 2,6-HNDP en ausencia y presencia de Fe(III)

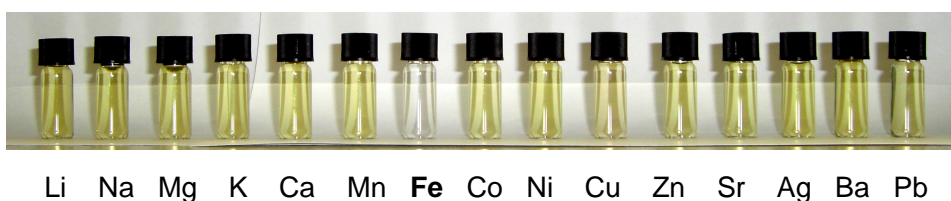


Figura III.B.25. Aspecto de las disoluciones del sensor 2,6-HNDP en THF:H₂O (2,57:1) a pH 7,0 en presencia de Li(I), Na(I), Mg(II), K(I), Ca(II), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Sr(II), Ag(I), Ba(II) y Pb(II) ([2,6-HNDP]=10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y [Metal]=50 $\mu\text{mol L}^{-1}$)

Respecto a los espectros de fluorescencia del sensor, se observó una gran disminución de la fluorescencia (quenching) del sensor cuando se adicionaba Fe, y en menor medida Cu, con respecto a las disoluciones de sensor en ausencia de metal y del resto de los metales estudiados (Figura III.B.26).

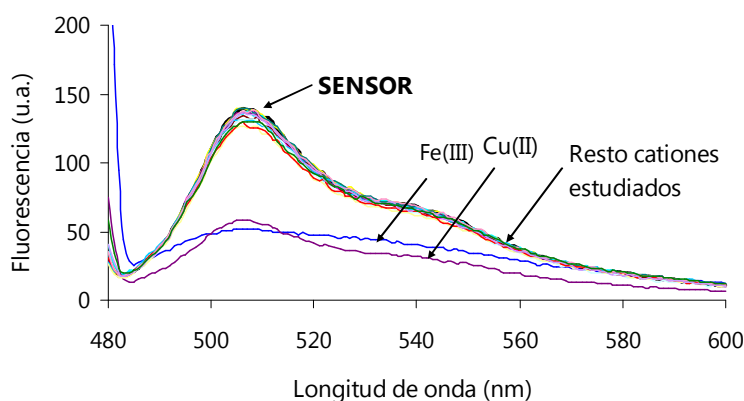


Figura III.B.26. Espectros de fluorescencia del reactivo 2,6-HNDP en disolución acu-orgánica THF:H₂O (2,57:1) a pH 7,0 en ausencia y presencia de los cationes metálicos estudiados (Li(I), Na(I), Mg(II), K(I), Ca(II), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Sr(II), Ag(I), Ba(II) y Pb(II)) ([2,6-HNDP]=10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Metal]=50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; λ_{exc} =475 nm)

La disminución de la fluorescencia inicial del sensor en presencia de Fe(III), y en menor medida de Cu(II), se debe probablemente a una transferencia electrónica desde estos iones metálicos activos desde un punto de vista redox, cuando el sensor se encuentra en estado excitado, derivando así en una desactivación no radiante desde el estado excitado [Fabrizzi y Poggi, 1995; Callan y col., 2005]. En la Figura III.B.27 se muestran las posiciones donadoras de la molécula sensora situadas en los átomos de N (3) y de O (2), coordinando al catión Fe(III). Ya que la base de Schiff sintetizada mostraba una respuesta más selectiva por el Fe(III) que por el resto de los cationes analizados, se decidió estudiar el sistema sensor 2,6-HNDP para la determinación del catión Fe(III) en disolución.

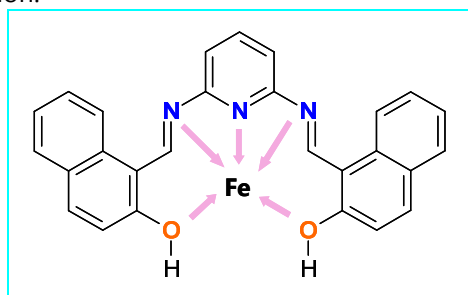


Figura III.B.27. Posiciones de coordinación en la formación del complejo 2-HNFT-Fe(III)

III.B.3.5. Determinación de la estequiometría del complejo 2,6-HNDP-Fe(III)

Al igual que se hizo con el anterior reactivo, se procedió a estudiar la estequiometría del complejo 2,6-HNDP-Fe(III), aunque en este caso se utilizó el **método de la relación molar**. Este método consiste en la medición de la señal espectrofotométrica del complejo metal-ligando en una serie de disoluciones donde se mantiene constante la concentración de uno de los dos componentes del complejo, mientras que se varía la del otro [Skoog y col., 2005]. En este estudio se mantuvo constante la concentración de Fe(III) a medida que se incrementaba la concentración de ligando 2,6-HNDP.

En la Tabla III.B.2 se indica la composición de las diferentes disoluciones empleadas para llevar a cabo este estudio estequiométrico. Así, se prepararon disoluciones con un volumen total de 10 mL, donde se añadieron: 1mL de disolución reguladora HEPES a pH 7,0 de concentración 1 mol L^{-1} , un volumen constante de 0,5 mL de Fe(III) de concentración $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, el volumen indicado en cada caso de disolución de ligando 2,6-HNDP (preparado en THF:H₂O (9:1)), 0,5 mL de agua y se enrasó finalmente con una mezcla de disolvente THF:H₂O (2,57:1). Hay que señalar que se utilizaron dos concentraciones distintas de reactivo ($0,75 \cdot 10^{-3}$ y $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) para evitar tomar volúmenes demasiado pequeños. Una vez preparadas todas las disoluciones, se midieron los valores de absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción (475 nm).

En este método, antes de llegar a la relación estequiométrica óptima metal-ligando, el metal queda en exceso en la disolución, por lo que las absorbancias deberían de ser corregidas con un blanco que tuviera la cantidad de metal que queda en exceso en cada disolución, si el metal absorbe a la longitud de onda de medida. No obstante, se demostró que el Fe(III) no absorbía a 475 nm en disolución, por lo que no influyó en la medida de la absorbancia. Por ello, las absorbancias se midieron frente a un blanco preparado de la misma manera que las disoluciones de estudio, pero sin contener metal ni reactivo.

En la Figura III.B.28 se representan las absorbancias medidas frente a la relación molar sensor/catión (2,6-HNDP/Fe(III)), observándose valores de absorbancia muy bajos para las relaciones molares más bajas. A partir del valor de 1, se produjo un aumento significativo del valor de la absorbancia a 475 nm. Para relaciones molares bajas (<1) el sensor adicionado reaccionaba con el catión Fe(III), produciéndose la desaparición del pico de absorbancia a 475 nm y desplazándose hacia una longitud de onda de 325 nm (como se vio anteriormente). Sin embargo, al superarse una relación molar ligando/catión de 1, el exceso de 2,6-HNDP sin complejar produjo la

característica banda de absorción del sensor a 475 nm, la cual aumentaba con la concentración de éste en disolución. Por tanto, la aplicación del método de la relación molar manteniendo constante la concentración de metal, indicaba una estequiometría 1:1 para el complejo estudiado.

Tabla III.B.2. Composición de las disoluciones utilizadas en la determinación de la estequiometría del complejo 2,6-HNDP-Fe(III) por el método de la razón molar con metal constante

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V _A (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V _B (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
V _C (mL)	0	0,2	0,4	0,6	1	-	-	-	-	-
V _D (mL)	-	-	-	-	-	0,7	0,9	1,1	1,3	1,5
V _{agua} (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
R _m	0	0,2	0,4	0,6	1	1,4	1,8	2,2	2,6	3
Abs (475 nm)	0,008	0,027	0,014	0,017	0,017	0,043	0,104	0,203	0,440	0,735

R_m: relación molar sensor/catión (2,6-HNDP/Fe(III))

Volumen final de cada muestra: 10 mL, obtenido mediante enrase con THF:H₂O (9:1)

A: Disolución reguladora HEPES 1 mol L⁻¹ a pH 7,0

B: Disolución acuosa de Fe(III) 1,5·10⁻³ mol L⁻¹

C: Disolución de 2,6-HNDP 0,75·10⁻³ mol L⁻¹ en THF:H₂O (9:1)

D: Disolución de 2,6-HNDP 1,5·10⁻³ mol L⁻¹ en THF:H₂O (9:1)

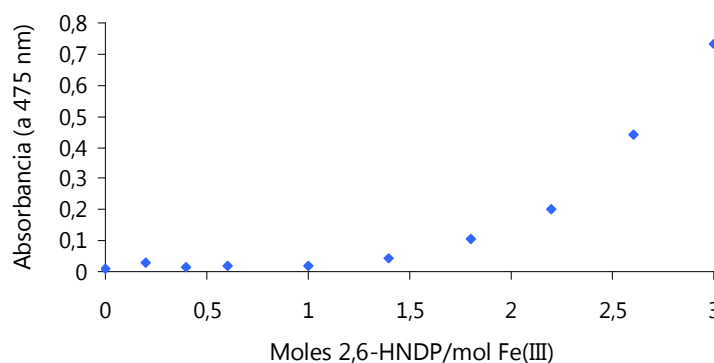


Figura III.B.28. Aplicación del método de la relación molar (Fe(III) constante) para la determinación de la estequiometría del complejo 2,6-HNDP-Fe(III) (condiciones en la Tabla III.B.2)

III.B.3.6. Rango de aplicabilidad del sensor 2,6-HNDP para la determinación de Fe (III) en disolución acuosa

Para evaluar la respuesta del sensor en función de la concentración de Fe(III), y determinar así el rango de aplicación del mismo en disolución, se adicionaron diferentes concentraciones de metal en presencia de una misma concentración del sensor. Para ello, en matraces aforados de 10 mL se adicionaron: 1 mL de disolución reguladora HEPES a pH 7,0 de concentración 1 mol L^{-1} , 1 mL de disolución inicial de sensor 2,6-HNDP de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ preparada en THF:H₂O (9:1), una alícuota de disolución acuosa patrón de Fe(III), según la concentración de metal a adicionar. Los matraces fueron enrasados con THF:H₂O (9:1). Como el volumen de la disolución patrón de Fe(III) fue variable según la concentración requerida, se complementaron las muestras con diferente volumen de agua hasta obtener un volumen total de agua de 2,8 mL. Así, la relación volumen de THF:volumen de agua final para todas las disoluciones fue de THF:H₂O = 2,57:1.

Como se observa en la Figura III.B.29, se produjo una disminución en la intensidad de fluorescencia del sensor a medida que se incrementó la concentración de Fe(III) en la disolución.

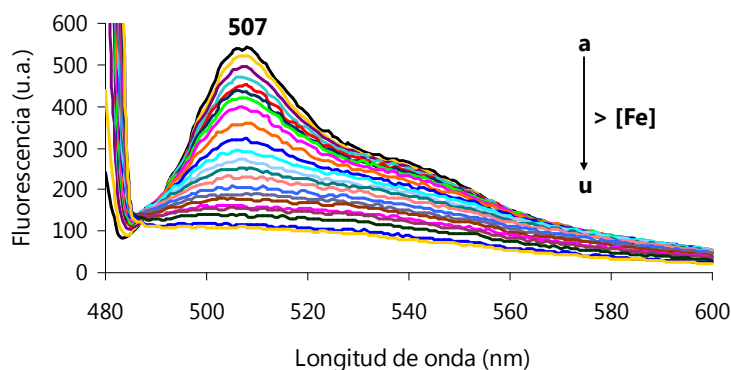


Figura III.B.29. Espectros de fluorescencia del sensor 2,6-HNDP en disolución acuo-orgánica THF:H₂O (2,57:1) a pH 7,0 en presencia de diferentes concentraciones de Fe(III) ([2,6-HNDP]= $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; [Fe(III)] ($\mu\text{mol L}^{-1}$): (a) 0; (b) 20; (c) 40; (d) 55; (e) 60; (f) 65; (g) 70; (h) 80; (i) 90; (j) 100; (k) 110; (l) 120; (m) 130; (n) 140; (ñ) 150; (o) 160; (p) 170; (q) 180; (r) 190; (s) 200; (t) 208; (u) 213; λ_{exc} =475 nm)

La atenuación de fluorescencia hace alusión a cualquier proceso en el que se produzca disminución de la intensidad de fluorescencia de una determinada muestra. Las interacciones moleculares que pueden dar lugar a este tipo de atenuación son numerosas, tales como, reacciones en estado excitado, reorganizaciones moleculares, procesos de transferencia de energía, formación de complejos en estado fundamental o atenuación estática, y atenuación colisional.

Entre los tipos de atenuación existentes, los más estudiados son la *atenuación dinámica o colisional* y la *atenuación estática*. La atenuación dinámica o colisional tiene lugar por colisiones entre el fluoróforo y la especie atenuadora de la fluorescencia al difundir por la disolución, mientras que en la atenuación estática las dos especies enlazan entre sí formando un complejo no fluorescente [Albani, 2004]. Para que tengan lugar ambos procesos, es necesario que se produzca contacto molecular. En la atenuación colisional, el atenuador debe difundir hacia el fluoróforo durante el tiempo de vida que éste permanece en el estado excitado. De esta manera, el fluoróforo vuelve al estado fundamental sin producirse emisión de fluorescencia. Hay que indicar que durante este proceso las especies no se ven alteradas químicamente. En cambio, en la atenuación estática tiene lugar una reacción entre el fluoróforo y la especie atenuadora formándose un nuevo complejo no fluorescente. Este proceso tiene lugar en el estado fundamental, sin producirse procesos de difusión ni colisiones moleculares [Lakowicz, 2006].

Los datos obtenidos para la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de Fe(III) adicionada a la disolución de sensor, fueron evaluados mediante la *ecuación de Stern-Volmer*, empleada en los casos de atenuación de fluorescencia, la cual viene dada por la siguiente expresión [Forcha y col., 2013]:

$$I_0 / I = 1 + K_{SV} [Q]$$

donde I_0 e I son las intensidades de fluorescencia correspondientes al sensor en ausencia y presencia de iones Fe(III) a 507 nm; $[Q]$ es la concentración del ión metálico Fe(III) (atenuador o "quencher") y K_{SV} es la constante de Stern-Volmer, la cual está relacionada con la accesibilidad del fluoróforo al "quencher", siendo su valor mayor cuanto mayor sea la accesibilidad.

Si el sistema siguiese la ecuación de Stern-Volmer se obtendría una representación lineal de I_0/I frente a la concentración de metal. Sin embargo, esto no siempre ocurre. Puede observarse una curvatura negativa (I_0/I es menor que lo esperado a concentraciones de Q elevadas), debido a la presencia de más de un grupo fluoróforo en la molécula o a la existencia de más de una conformación en dicha molécula, que

resulta en diferentes grados de accesibilidad para la especie atenuadora, según cómo esté colocado el grupo fluoróforo. La otra posibilidad es una desviación positiva (I_0/I es mayor que lo esperado para concentraciones elevadas de Q). Esto se explica mediante la existencia de un "quenching" combinado dinámico y estático, donde la especie atenuadora provoca tanto colisiones como enlaces con el fluoróforo [Valeur, 2002; Lakowicz, 2006].

En la Figura III.B.30 se muestra la representación de Stern-Volmer para el sistema 2,6-HNDP-Fe(III) estudiado, donde puede observarse una no linealidad con cierta desviación positiva con el incremento de la concentración de ión metálico, siendo los valores I_0/I algo superiores a los esperados en el caso de concentraciones de catión elevadas. En este caso, la desviación de la linealidad puede atribuirse a la existencia de ambos tipos de atenuación en el sistema.

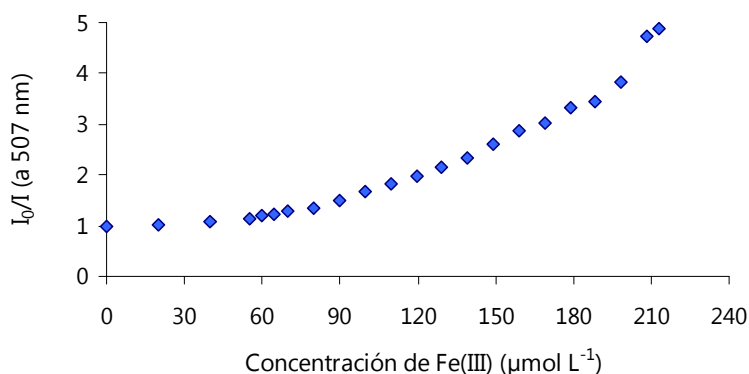


Figura III.B.30. Representación de la ecuación de Stern-Volmer para el sensor fluorescente 2,6-HNDP en la detección de Fe(III)

Para resolver la no linealidad de la representación, se suele emplear la ecuación de Stern-Volmer modificada, [Chen y col., 2006; Suresh-Kumar y col., 2006; Koneswaran y Narayanaswamy, 2009]. Para ello, la atenuación estática se explica introduciendo en la ecuación original un factor adicional C y se emplea el logaritmo de la ecuación así obtenida:

$$I_0 / I = (1 + K_{sv} [Q]) / C$$

$$\log(I_0 / I) = K_{sv} [Q] + C$$

Como puede observarse en la Figura III.B.31, la representación de *Stern-Volmer modificada de $\log(I_0/I)$* frente a $[Q]$ muestra un buen comportamiento lineal ($R^2=0,995$) en el rango estudiado desde **55 hasta 213 $\mu\text{mol L}^{-1}$** de Fe(III).

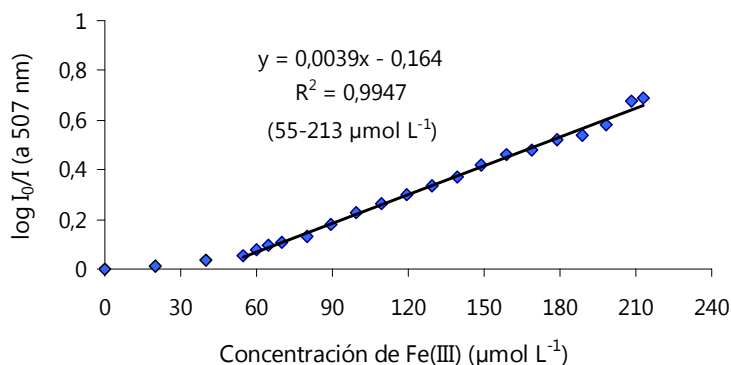


Figura III.B.31. Representación de la *ecuación de Stern-Volmer modificada* para el sensor 2,6-HNDP en la detección de Fe(III)

Para el cálculo de la constante de formación del complejo formado ($\log \beta$), se recurrió a la ecuación modificada de *Henderson-Hasselbalch*, donde se sustituye $-pH$ por $\log[\text{catión}]$ y pK_a por $\log \beta$ [de Silva y Gunaratne, 1990; de Silva y col., 1995]:

$$\log(I_{\max} - I) / (I - I_{\min}) = \log[\text{catión}] + \log \beta$$

donde I_{\max} es la intensidad de fluorescencia máxima, I_{\min} es la intensidad de fluorescencia mínima e I es la fluorescencia obtenida tras cada adición de Fe(III). Todos estos valores fueron tomados a la longitud de onda $\lambda=507$ nm. Posteriormente, se representó $\log(I_{\max}-I)/(I-I_{\min})$ frente a $\log [Fe(III)]$. Finalmente, se obtuvo un valor para el $\log \beta$ de 4,01, siendo el valor de la constante $\beta=10^{4,01}=1,023 \cdot 10^4$.

III.B.3.7. Selectividad del sensor 2,6-HNDP

Por último, se estudió la selectividad o especificidad de la molécula sensora 2,6-HNDP por el catión Fe(III) evaluando los cambios producidos en la intensidad de fluorescencia del sensor al interaccionar con otros cationes, tales como Li(I), Na(I), Mg(II), K(I), Ca(II), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Sr(II), Ag(I), Ba(II) y Pb(II). Así, se prepararon distintas disoluciones con los cationes a estudiar, adicionando 1 mL de disolución reguladora HEPES a pH 7,0 de concentración 1 mol L^{-1} , 1 mL de disolución

de sensor de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ preparada en THF:H₂O (9:1) y 1 mL de disolución acuosa patrón de metal de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$, enrasando finalmente hasta un volumen final de 10 mL con THF:H₂O (9:1). La relación volumen:volumen de THF:H₂O en la disolución fue de 2,57:1, siendo las concentraciones finales de sensor y metal de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ y $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

En la Figura III.B.32 se muestra la comparación de la variación de la fluorescencia inicial del sensor causada por todos los cationes metálicos estudiados, incluyendo también la respuesta del sensor en presencia de Fe(III). Se ha representado la intensidad relativa I/I_0 ; donde I es la intensidad tras la adición del catión metálico e I_0 representa la intensidad inicial del sensor en ausencia de metal (para $\lambda=507 \text{ nm}$). Para la mayoría de los cationes estudiados, no se aprecia disminución de la fluorescencia cuando éstos se ponen en contacto con la molécula sensora en el seno de la disolución acuo-orgánica. Sin embargo, sí se observa una disminución significativa de intensidad con respecto a la inicial del sensor para el Fe(III) (del 90%). Además, en el caso del Cu(II) también se detectó una disminución de la intensidad de fluorescencia, pero algo menor (aproximadamente del 50%).

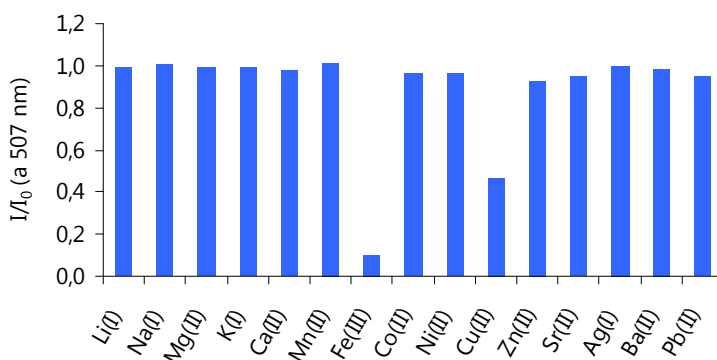


Figura III.B.32. Respuesta del sensor de fluorescencia 2,6-HNDP a la presencia de Fe(III) y otros iones metálicos en disolución acuo-orgánica THF:H₂O (2,57:1) a pH 7,0. ([2,6-HNDP]= $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; [Metal]= $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; $\lambda_{\text{exc}}=475 \text{ nm}$)

Ya que el catión Cu(II) también provocó una disminución notable en la fluorescencia inicial del sensor 2,6-HNDP en disolución, se procedió a estudiar si la presencia de iones Cu(II) en la disolución de sensor y Fe(III) ejercía o no influencia en la determinación del catión Fe(III). Para ello, se prepararon una serie de disoluciones de sensor que contenían determinadas concentraciones de Fe(III), las cuales se encontraban dentro del rango de linealidad del método expuesto: 50, 70, 100, 120, 150,

170 y 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Disoluciones 1-7), por adición de una disolución patrón de metal de concentración 2 mmol L^{-1} . De igual forma, se prepararon idénticas disoluciones conteniendo ión Cu(II) además de Fe(III). La composición de estas disoluciones se resume en la Tabla III.B.3. Además de los distintos volúmenes de disolución reguladora, disolución de sensor y disoluciones de metal (Fe(III) o Fe(III)+Cu(II), en cada caso), se añadieron los volúmenes oportunos de agua, para que todas las disoluciones tuvieran la misma matriz, compuesta por THF:H₂O (2,57:1).

Tabla III.B.3. Composición de las disoluciones utilizadas para el estudio de la influencia del Cu(II) en la determinación fluorimétrica de Fe(III) mediante el sensor 2,6-HNDP

Muestra	1	2	3	4	5	6	7
V _A (mL)	1	1	1	1	1	1	1
V _B (mL)	1	1	1	1	1	1	1
V _C (mL)	0,25	0,35	0,50	0,60	0,75	0,85	1
V _{agua} (mL)	0,75	0,65	0,50	0,40	0,25	0,15	0
Muestra	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'
V _A (mL)	1	1	1	1	1	1	1
V _B (mL)	1	1	1	1	1	1	1
V _D (mL)	0,25	0,35	0,50	0,60	0,75	0,85	1
V _{agua} (mL)	0,75	0,65	0,50	0,40	0,25	0,15	0

Volumen final de cada muestra: 10 mL, obtenido mediante enrase con THF:H₂O (9:1)

A: Disolución reguladora HEPES 1 mol L^{-1} a pH 7,0

B: Disolución de 2,6-HNDP 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ en THF:H₂O (9:1)

C: Disolución acuosa de Fe(III) 2 mmol L^{-1}

D: Disolución acuosa de Fe(III) y Cu(II) 2 mmol L^{-1}

Una vez preparadas todas las disoluciones, se registraron los espectros de fluorescencia de las mismas, cuya intensidad máxima a 507 nm se ha representado frente a la concentración de metal (Fe(III) o Fe(III)+Cu(II)) en la Figura III.B.33. En base a los resultados obtenidos, se puede confirmar que es posible determinar fluorimétricamente la concentración de catión Fe(III) en disolución en presencia de concentraciones equimolares de Cu(II), dentro del intervalo de aplicación del método.

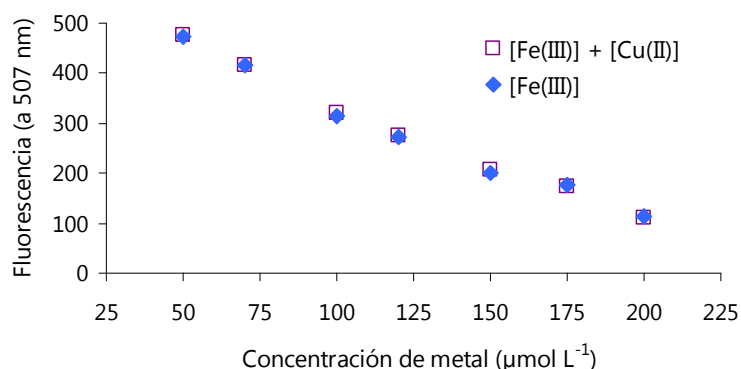


Figura III.B.33. Intensidad de fluorescencia del sensor 2,6-HNDP en disolución acuo-orgánica THF:H₂O (2,57:1) a pH 7,0 con Fe(III) y con Fe(III)+Cu(II) (condiciones en la Tabla III.B.3)

III.B.4. Conclusiones

Se han sintetizado, caracterizado y estudiado dos bases de Schiff como sensores fluorimétricos para la determinación de pequeñas concentraciones de Fe(III) en disolución acuo-orgánica.

En el primer caso, se sintetizó la tiosemicarbazona 2-hidroxinaftaldehído-N-feniltiosemicarbazona (2-HNFT), un reactivo con altas propiedades como complejante de metales de transición y que presentaba buenas características espectrales para su aplicación como sensor químico óptico. Primeramente, se estudió su pH óptimo de aplicación, estableciéndose así un valor de pH de 7,4. Su respuesta óptica fue evaluada frente a una serie de cationes de gran interés biológico y medioambiental en disolución acuo-orgánica formada por tetrahidrofurano:agua, mostrando una respuesta selectiva por el Fe(III). La estequiometría del enlace catión/ligando fue determinada por el método de las variaciones continuas obteniéndose una estequiometría 1:1. En contacto con este catión, el sensor experimentó un aumento de fluorescencia con respuesta lineal a medida que aumentaba la concentración de Fe(III) en disolución y el logaritmo de la constante de formación ($\log \beta$) fue de 4,56. De esta forma, el intervalo de aplicabilidad del método se estableció en el rango de 15-37,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Dicho aumento de fluorescencia se explicó por el hecho de no producirse isomerización en el enlace C=N, que hubiese resultado en una desactivación no

radiante del estado excitado. Debido al enlace entre el catión y el ligando, el complejo experimenta un aumento de rigidez, lo cual hace que aumente la fluorescencia. Así, se desarrolló el empleo de esta molécula como un sensor ratiométrico "Off-On" para la determinación de Fe(III), mostrándose una respuesta selectiva frente al resto de cationes.

Por otra parte, el segundo sensor sintetizado fue la base de Schiff 2,6-bis(N-(2-hidroxí-1-naftilmetilén)-diamino)-piridina (2,6-HNDP) con grupos hidroxinaftaldehído y piridina en su estructura, con gran afinidad para complejar a cationes metálicos en estado acuoso. Primeramente, se estudió su pH óptimo de aplicación, estableciéndose así un valor de pH de 7,0. Su respuesta óptica fue también evaluada frente a una serie de cationes de gran interés biológico y medioambiental en disolución acuosa-orgánica formada por tetrahidrofurano:agua, mostrando nuevamente una respuesta selectiva por el Fe(III). La estequiometría del enlace catión/ligando fue determinada por el método de la relación molar manteniendo la concentración de metal constante, obteniéndose una estequiometría 1:1. Al contrario que en el caso anterior, los cambios observados en la fluorescencia del sensor consistían en una disminución de la intensidad de la fluorescencia, la cual era función de la concentración de Fe en disolución. Esta atenuación de fluorescencia fue estudiada mediante la ecuación de Stern-Volmer modificada, obteniéndose un intervalo de aplicación lineal en el rango (55-213 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe(III)), incluso en presencia de cantidades equimolares de Cu(II), catión que también provocaba disminución en la respuesta fluorimétrica del sensor. El logaritmo de la constante de formación ($\log \beta$) fue de 4,01.

Tanto uno como otro mostraron validez para ser aplicados en un amplio rango de valores de pH, mostrándose la respuesta constante en el intervalo de valores fisiológicos, por lo que, en estudios posteriores, podrían aplicarse en la determinación de Fe(III) en suero o muestras biológicas, siempre y cuando la concentración de Fe(III) se encuentre dentro del intervalo de aplicación para cada sensor. Ambos sensores fueron sintetizados mediante sencillas reacciones de condensación a partir de sus reactivos de partida y caracterizados mediante espectros de masas, de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) y de carbono (^{13}C -RMN).

Capítulo IV.

Evaluación de la contaminación metálica en la Bahía de Algeciras

Resumen

En este capítulo se ha estudiado la calidad medioambiental de las aguas de la Bahía de Algeciras, mediante la evaluación de los niveles metálicos totales de Zn, Cd, Pb y Cu, y su especiación química en este ecosistema acuático. Dicho ecosistema se encuentra en un entorno caracterizado por una intensa actividad antropogénica, debido al gran polo industrial situado en esta zona de la provincia de Cádiz. Esta industrialización ha ido creciendo en los últimos años, por lo que es de gran interés evaluar la influencia de este impacto en el estado medioambiental del ecosistema acuático desde el punto de vista de una posible contaminación metálica. Esta área se encuentra expuesta a una contaminación crónica persistente, donde se prevén posibles aportes continuos de metales pesados, entre otros contaminantes.

Los metales pesados presentan una gran importancia en los ecosistemas acuáticos, debido a que no son biodegradables y tienden a acumularse. Por ello, son considerados como “sustancias prioritarias” que necesitan ser monitorizadas (Directiva Marco 60/2000/CE), ya que su presencia en los ambientes acuáticos puede llegar a afectar seriamente la calidad de las aguas y del ecosistema en general.

Por ello, en este capítulo se ha evaluado la calidad medioambiental de la Bahía de Algeciras a partir de la determinación de los niveles de metales pesados en muestras de agua, sedimentos y biota, centrando el estudio en cuatro metales de diferente naturaleza: Cu y Zn, los cuales son considerados elementos esenciales en determinadas concentraciones, y Pb y Cd, de carácter tóxico. El estudio de estos tres compartimentos ambientales permite una visión global y un estudio integrado de la influencia de las actividades antropogénicas e industriales de la zona, en las que los metales pesados tienen una destacada presencia.

Hay que señalar que estos estudios se han realizado dentro de un proyecto de investigación de excelencia del Plan Andaluz de Investigación titulado “Evaluación del efecto de la contaminación por actividades antropogénicas crónicas sobre el medio litoral” (PAI 2006: PO6-FQM-02075), concedido por la Junta de Andalucía, centrado en el estudio de la Bahía de Algeciras, y realizándose la evaluación de los niveles de metales pesados (analizados en el grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente tesis), la determinación de otras sustancias contaminantes prioritarias, tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), policlorados dibenzo-para-dioxinas (PCDDs) y polibromados difenilesteres (PBDEs).

Capítulo IV. A

Introducción

IV.A.1. Descripción de la zona de estudio: Bahía de Algeciras

IV.A.1.1. Situación geográfica

La Bahía de Algeciras (también conocida como Bahía de Gibraltar) es una bahía situada en el sur de España. Concretamente, se encuentra localizada en el suroeste de la costa mediterránea española entre 36° 6' 0" y 36° 11' 0" Norte, y 5° 26' 45" y 5° 21' 0" Oeste. Está delimitada al oeste por Punta Carnero, en la costa algecireña, y por Punta Europa al este, en Gibraltar (ambos límites señalizados mediante faros). La bahía tiene unos 11 km de largo por unos 9 km de ancho, lo que se traduce en una superficie de aproximadamente 100 km², alcanzando profundidades de hasta 400 m en el centro de la misma [Sánchez-Garrido y col., 2014]. En las Figuras IV.A.1 y IV.A.2 se puede observar la situación geográfica de la Bahía de Algeciras.

Sus riberas pertenecen, de oeste a este y en sentido horario, a los municipios de Algeciras, Los Barrios, San Roque, La Línea de la Concepción y Gibraltar (Figura IV.A.1). En sus orillas se encuentran dos puertos muy activos, el de Gibraltar y el de Algeciras el cual, con el nombre de Puerto Bahía de Algeciras, se ha posicionado como uno de los principales puertos de Europa y del Mediterráneo en tráfico marítimo y en movimiento de contenedores [http://www.portofalgeciras.com/handbook_2013/].

La Bahía de Algeciras es un enclave geográfico estratégico por hallarse en el estrecho de Gibraltar, lugar de contacto entre el Mar Mediterráneo y el Océano Atlántico. Se encuentra englobada en el conjunto geológico conocido como Complejo del Campo de Gibraltar, el cual constituye la entidad geológica más característica y ampliamente representada de la provincia de Cádiz. Este complejo está constituido por varias unidades tectónicas formadas en su práctica totalidad por sedimentos arcillosos y areniscos de edad cretácica y terciaria, depositados en ambientes marinos profundos. Se conocen unidades tectónicas comparables en todo el norte de África, lo que significa que los materiales del Campo de Gibraltar se depositaron en una extensa cuenca sedimentaria de la que también formaron parte las cordilleras alpinas norteafricanas [Plan de Calidad Ambiental del Campo de Gibraltar, 2001].

Respecto a la geomorfología, es un espacio donde existe una gran variedad de formas, desde acantilados de muy lenta evolución, hasta depósitos de arena modelados por la acción de las corrientes de deriva y formaciones dunares de origen eólico, a lo cual se debe añadir la relevancia de su morfología diluvial desarrollada por los depósitos de los ríos, en cuyas desembocaduras se encuentran pequeños estuarios y cordones arenosos de infiltración [Plan de Calidad Ambiental del Campo de Gibraltar, 2001].



Figura IV.A.1. Situación geográfica de la Bahía de Algeciras



Figura IV.A.2. Zonas destacadas de la Bahía de Algeciras

Los ríos más importantes son los ríos Palmones y Guadarranque, cuyas aguas desembocan en la Bahía de Algeciras (Figura IV.A.2). Además de los contaminantes transportados a través de los ríos, la bahía recibe contaminantes de forma directa, debido a que es uno de los puertos con más tráfico marítimo de España y que alberga un gran número de industrias con sus correspondientes vertidos. Aún así, el agua de esta bahía cuenta con un alto grado de renovación debido a su proximidad al Estrecho de Gibraltar, donde el Mar Mediterráneo y el Océano Atlántico convergen, y a las fuertes corrientes que predominan en esta zona. Estos factores, junto con la profundidad de sus aguas, hacen que los contaminantes se dispersen de forma efectiva, de manera que sus efectos se ven considerablemente reducidos [Morillo y col., 2007; Morillo y Usero, 2008].

Asimismo y debido a su enclave geográfico, el Campo de Gibraltar y, en concreto, la Bahía de Algeciras, está constituida por una gran riqueza en ecosistemas y biodiversidad. Es, por tanto, un lugar geográficamente único y privilegiado que alberga gran variedad de seres vivos, tanto en el medio marino como en el terrestre. Concretamente el Estrecho de Gibraltar, es una de las zonas más importantes de migración intercontinental de aves. Entre ellas, destacan las predadoras, cuya presencia se ve favorecida por el buen estado de los bosques y la existencia de gran número de roedores. En cuanto a las especies terrestres, existe una gran diversidad destacando el popular macaco Gibraltareño, único primate que vive en libertad en Europa. Por ello, es una de las zonas de Europa con mayor riqueza faunística.

Respecto a la flora y vegetación, las comunidades vegetales en torno a la Bahía de Algeciras presentan una gran variedad y riqueza por motivos climatológicos, geográficos, geológicos e históricos, presentando un gran valor de conservación y una elevada biodiversidad. Los ecosistemas más importantes que pueden encontrarse son el alcornocal, el acebuchal, el quejigal, el melojar, el matorral y la laurisilva. Muchas de las plantas existentes son endémicas de la zona, donde algunas se encuentran en peligro de extinción [Verdú-Baeza, 2008].

La bahía posee una amplia variedad de especies y una riqueza natural de hábitats, que ha llevado a las administraciones públicas a declarar varios espacios protegidos, entre ellos el Parque Natural del Estrecho, reserva de la biosfera, declarado como Zona de Especial Protección para las Aves (ZEPA). Además, con la denominación de Lugar de Importancia Comunitaria (LIC) se encuentran las Marismas del Río Palmones, LIC Fondos Marinos de las Marismas del Río Palmones, LIC Estrecho Oriental (que se solapa con el declarado LIC Southern Waters of Gibraltar de Reino Unido). Todos estos espacios pertenecen a la Red Natura 2000 europea que distingue los ecosistemas más singulares de la Unión Europea [Environmental Safety Group y col., 2009].

IV.A.1.2. Aspectos climatológicos de la zona

Como se ha comentado, la Bahía de Algeciras es un enclave geográfico estratégico por hallarse en el estrecho de Gibraltar, lugar de contacto entre el Mar Mediterráneo y el Océano Atlántico.

Aspectos meteorológicos como son el régimen de precipitaciones, temperatura, radiación solar y vientos, influyen fuertemente sobre el caudal de los aportes fluviales, así como en la composición y producción biológicas. Esto puede repercutir sobre las áreas marinas que reciben estas aguas.

En general, el clima de la zona del Campo de Gibraltar se puede definir como templado, de transición entre el mediterráneo y el oceánico, caracterizado por unas condiciones de temperaturas suaves y regulares, y por precipitaciones irregulares y de carácter torrencial, con una media anual situada en los 1.000 litros por metro cuadrado, entre los meses de noviembre y marzo. Como toda la zona del estrecho, es muy importante la influencia del viento. Los vientos dominantes son los oceánicos (poniente y vendaval) que traen humedad y lluvias, y el levante, que sopla sobre todo durante el verano y el otoño, provocando unos niveles de humedad altos que permiten la existencia de un microclima subtropical en los llamados "canutos" (bosques galería típicos de esta y otras sierras de Andalucía) de las sierras que miran al sur y al este [Anexo VI del Plan de Ordenación de los Recursos Naturales de los Parajes Naturales Marismas del Río Palmones y Estuario del Río Guadiaro, BOJA nº 7 de 13 de enero de 2014].

Se diferencian tres sectores climáticos dentro del territorio que ocupa la comarca: las zonas este y sureste presentan un clima mediterráneo subtropical; la zona suroeste posee un clima oceánico; mientras que el resto del área posee un clima mediterráneo semi-continental. La temperatura media anual para el conjunto de la comarca se encuentra en torno a los 17 °C [Plan de Calidad Ambiental del Campo de Gibraltar, 2006].

IV.A.1.3. Preocupación medioambiental de la Bahía de Algeciras

La situación industrial actual en el Campo de Gibraltar tiene su origen en 1966, cuando se establece esta área como "Zona de Preferente Localización Industrial". A partir de entonces, se produce la instalación masiva de un gran número de industrias y el puerto Bahía de Algeciras comienza a ser uno de los principales puertos de España. Sin embargo, la gran preocupación medioambiental y social se desata a partir de la

instalación en esta zona de varias fábricas y refinerías, como las pertenecientes a “Cepsa” y “Repsol”.

El elevado número de industrias en un espacio tan reducido, junto con la presunta escasa gestión de sus residuos, ha estado provocando una gran inquietud en cuanto a una posible contaminación de tipo acumulativa en esta zona. Además, a estos residuos se les suman grandes cantidades de hidrocarburos que, de forma accidental o intencionada, pueden verter buques y otras embarcaciones, por ser ésta una de las zonas con más tráfico marítimo de España.

Como ya se ha mencionado, es obvio afirmar que la Bahía de Algeciras posee un gran valor ambiental, pero al mismo tiempo se encuentra sometida a una gran variedad de fuentes potenciales de contaminación. Además, la falta de un acuerdo sobre los espacios marinos en la bahía entre todas las partes implicadas, promovido por la controversia sobre la nacionalidad del territorio de Gibraltar y la discordancia sobre la interpretación del *Artículo X del Tratado de Utrecht*, ha dado lugar, directa o indirectamente, a conductas, acciones y actividades probablemente no respetuosas con el medio; entrañando riesgos, promoción o desarrollo de actividades económicas incompatibles con un modelo de desarrollo sostenible [Verdú-Baeza, 2008].

En consecuencia, la Bahía de Algeciras ha sufrido una contaminación de tipo crónica durante las últimas décadas, provocada fundamentalmente por dos grandes focos: la contaminación procedente de actividades marítimas y la que se encuentra asociada a la actividad industrial situada en esta área [Morales-Caselles y col., 2008a].

IV.A.1.3.1. Contaminación asociada a actividades marítimas

El Puerto Bahía de Algeciras es uno de los principales puertos españoles. Por su situación geográfica así como por su inmensa actividad industrial y comercial, tiene un gran tráfico marítimo con numerosas embarcaciones que transitan por él. Este hecho hace que, además de ser uno de los más importantes, esté sujeto a un gran riesgo de contaminación.

La situación actual de controversia sobre los espacios marinos adyacentes al Peñón, consecuencia de las diversas posturas en relación con el ejercicio de competencias sobre el mar, provoca situaciones que desembocan en graves problemas medioambientales promovidos por [Environmental Safety Group y col., 2009]:

- Falta de coordinación entre las administraciones con competencia en la regulación del tráfico marítimo.
- Falta de coordinación en las actividades marítimas realizadas en la bahía y en el control de los buques.
- Falta de coordinación entre los espacios naturales protegidos.

Entre los numerosos contaminantes vertidos en estas aguas, como consecuencia de estas actividades, destacan los hidrocarburos, los cuales provocan un deterioro continuo y prolongado en este ecosistema marino. Los vertidos de hidrocarburos en esta zona proceden mayoritariamente del lavado de tanques, aguas de sentina u operaciones de suministro de combustible. En el mejor de los casos, estos vertidos se producen de forma inevitable y no en grandes cantidades. Sin embargo, no se descarta que en determinados casos las entradas de residuos al mar hayan podido realizarse de forma intencionada [Verdú-Baeza, 2008].

Además, la inexistencia de canales de navegación en la bahía, entre Gibraltar y Algeciras, y la falta de diálogo entre las autoridades marítimas han provocado que la situación en la zona sea insostenible y algunos accidentes podrían haberse evitado fácilmente.

Hay que destacar que muchos de estos accidentes son motivados por las condiciones meteorológicas adversas en esta zona del Estrecho, donde más del 54% de los días del año se dispone de visibilidad pobre o moderada y un 13% de los días existe una niebla persistente. También hay que tener en cuenta los fuertes vientos procedentes del este (levante), frecuentes entre los meses de abril y octubre, así como los vientos que vienen del oeste (poniente), más usuales entre noviembre y marzo. Estas rachas de vientos pueden alcanzar velocidades de hasta 125 km h^{-1} en el caso de los vientos del este y 90 km h^{-1} en el caso de provenir del oeste [Periáñez y Pascual-Granged, 2008].

Los episodios de accidentes de buques y petroleros en estas aguas han dado lugar a catástrofes medioambientales conocidas como "mareas negras". En los últimos años se pueden destacar los siguientes casos de buques siniestrados en la Bahía de Algeciras (cuyos datos se pueden encontrar en informes oficiales ofrecidos por el Ministerio de Fomento) y que presentaron consecuencias medio ambientales: el abordaje de los buques "Ciudad de Ceuta" - "Ciudad de Tánger", en julio de 2000 [Ministerio de Fomento, 2000a]; el abordaje de los buques "Mar Rocío" y "SKS Trinity", en agosto de 2000 [Ministerio de Fomento, 2000b]; la colisión del buque "Euroferrys Pacífica" contra el muelle de La Galera en el Puerto de Algeciras, en junio de 2001 [Ministerio de Fomento, 2001a]; la colisión de los buques "Indalo" y "Al Mansour", en

agosto de 2001 [Ministerio de Fomento, 2001b]; el accidente del buque "Spabunker Cuatro", en enero de 2003 [Ministerio de Fomento, 2003]; el abordaje entre los buques "Atlas" y "Avenmar Dos", en noviembre de 2006 [Ministerio de Fomento, 2006]; y la varada del buque "Sierra Nava" en enero de 2007 [Ministerio de Fomento, 2007].

Los productos más frecuentemente vertidos al mar como consecuencia de estas actividades y accidentes marítimos son el petróleo, fuel, y otros combustibles. Todos ellos están formados por hidrocarburos, los cuales constituyen un tipo de contaminantes muy potentes y tóxicos, que son perjudiciales para la totalidad del ecosistema una vez entran en contacto con éste. Estas sustancias son generalmente poco solubles en agua, aunque la solubilidad puede variar dependiendo de la naturaleza química de los hidrocarburos y de la temperatura, lo que provoca un aumento de esta propiedad. Por su baja solubilidad y diferencia de densidad, los hidrocarburos tienden a esparcirse rápidamente formando capas que dificultan la interacción de la flora y la fauna marina con la atmósfera, además de ser muy difíciles de limpiar una vez entran en contacto con el agua. Estos productos son altamente tóxicos (sobre todo los hidrocarburos aromáticos simples y los policíclicos (PAHs)), pudiendo provocar serias repercusiones tanto en el ecosistema como en el ser humano [Sammarco y col., 2013; Liu y col., 2013c].

IV.A.1.3.2. Contaminación asociada a zonas industriales de la Bahía de Algeciras

La Bahía de Algeciras sostiene una actividad industrial bastante intensa, por el gran número de industrias allí ubicadas. Algunas de estas industrias pertenecen a la *Asociación de Grandes Industrias del Campo de Gibraltar* (AGI). Ésta es una asociación cuyas finalidades principales son promover y coordinar las iniciativas de las empresas asociadas en beneficio de la Comarca del Campo de Gibraltar, así como defender los intereses de las empresas constituyentes y contribuir activamente al desarrollo y mejora del entorno. Como se ha comentado anteriormente, los municipios que componen la Bahía de Algeciras son Algeciras, Los Barrios, San Roque, La Línea de la Concepción; si bien, el Campo de Gibraltar lo constituyen además el término de Tarifa (orientado hacia el Océano Atlántico), Castellar de la Frontera y Jimena de la Frontera (ambos en el interior de la comarca).

Así, en esta zona, destacan las grandes áreas industriales de la ribera de la Bahía de Algeciras, entre ellas las pertenecientes a San Roque, Los Barrios y Algeciras. En el primero de estos municipios se encuentra la mayor aglomeración de industrias de la comarca. Las principales zonas industriales presentes son las de Campamento-Incosur, Polígono Industrial "Guadarranque", Polígono Industrial San Roque ("La Pólvora") y Zona Industrial "El Cañuelo" (Guadiaro), donde son numerosas las industrias

establecidas, destacando entre ellas las dedicadas a la transformación de productos petroquímicos y de gas natural. En el municipio de Los Barrios destacan los Polígonos Industriales de Palmones (denominados I, II y III) y el Parque Empresarial y Tecnológico Las Marismas de Palmones, con la importante central térmica de Los Barrios y la empresa Acerinox, entre otras industrias. En Algeciras existen cuatro zonas industriales establecidas, Cortijo Real, La Menacha, Las Pilas y Los Guijos, con empresas dedicadas principalmente a la transformación de metales [Cámara de Comercio del Campo de Gibraltar (http://www.camaracampodegibraltar.com/zonas_industriales/catalogo.html)].

A continuación se enumeran y describen brevemente las principales grandes industrias situadas en la Bahía de Algeciras [Asociación de Grandes Industrias en el Campo de Gibraltar (<http://www.agicg.es/>)]:

- **Abelló Linde S.A.** es la filial española de “The Linde Group”, grupo internacional líder de mercado a nivel mundial en gases. La división de gases de la empresa Linde, ofrece productos que cubren una amplia variedad de aplicaciones en la industria, la medicina, la protección del medio ambiente, la investigación y el desarrollo. Se encuentra ubicada en La Línea de la Concepción.
- **Abengoa Bioenergía** actúa en el sector energético y realiza actividades de producción industrial. Se centra en el desarrollo de nuevas tecnologías para la producción de biocombustibles y bioproductos químicos que utilizan la biomasa (cereales, caña de azúcar, biomasa celulósica, semillas oleaginosas) como materia prima. Estos nuevos productos, más sostenibles, están enfocados a la sustitución inmediata de los ya existentes derivados de la industria petroquímica. Abengoa Bioenergía San Roque S.A. es la sociedad titular de la planta construida en terrenos anexos a la Refinería Gibraltar, propiedad de Cepsa, a la cual se encuentra destinada toda su producción de biodiesel.
- **Acerinox S.A.** es un grupo empresarial multinacional español, reconocido internacionalmente como una de las empresas más competitivas en la fabricación de aceros inoxidables. Una de sus plantas de fabricación se sitúa en el polígono industrial de Palmones (perteneciente a Los Barrios).
- **Air Liquide**, líder mundial en la producción y comercialización de gases para la industria, la salud y el medio ambiente. Produce gases procedentes del aire (oxígeno, nitrógeno, argón) e hidrógeno. Cuenta con una amplia e importante red internacional de centros de investigación. Una de sus empresas se encuentra situada en el polígono industrial de Palmones (Los Barrios).

- **APM Terminals Algeciras S.A.** es una terminal de contenedores que constituye uno de los centros de transbordo más importantes del Mediterráneo. En el año 2010 fueron movidos un total de aproximadamente 2.800.000 TEUS (contenedor estándar de 6 metros). Se ha convertido en una referencia mundial en innovación y respeto por el medio ambiente, por reducir el consumo de combustibles en las grúas y las emisiones de CO₂. Esta terminal se encuentra en el muelle Juan Carlos I, en el término de Algeciras.
- La **Refinería "Gibraltar-San Roque" de CEPSA**, ubicada en el término de San Roque (entre los núcleos de Puente Mayorga y Guadarranque), es una refinería de petróleo que desarrolla su actividad en el campo del refino del petróleo y fabricación de lubricantes, siendo hoy un complejo industrial moderno que emplea la tecnología más innovadora a nivel europeo con el fin de lograr el máximo aprovechamiento energético.
- La **Fábrica de Guadarranque de CEPSA Química**, se dedica a la producción de ácido tereftálico purificado (PTA) para su aplicación en la producción del polímero termoplástico PET (tereftalato de polietileno), utilizado fundamentalmente en la producción de fibras de poliéster de aplicación textil, film de poliéster para empaquetado y electrónica, y resina de poliéster para la fabricación de botellas. Se encuentra ubicada en el municipio de San Roque. Las materias primas principales: meta-xileno, para-xileno e hidrógeno son suministradas por la Refinería "Gibraltar- San Roque" del grupo CEPSA, con la que mantiene un alto grado de integración.
- La **Fábrica de Puente Mayorga de CEPSA Química** produce alquilbenceno lineal (LAB), el cual se emplea como materia prima para detergentes, ácido sulfónico y otros disolventes. Pertenece al término de San Roque. En total integración con la Refinería "Gibraltar-San Roque", la fábrica de Puente Mayorga recibe de la Refinería las materias primas utilizadas en su proceso.
- La **Compañía Logística de Hidrocarburos (CLH)** es la empresa líder de transporte y almacenamiento de productos petrolíferos en el mercado español, con una red de oleoductos de más de 3.800 kilómetros y 37 instalaciones de almacenamiento. Integrada dentro de este grupo, CLH Aviación, está presente en la mayoría de los aeropuertos españoles ofreciendo servicios de almacenamiento, distribución y puesta a bordo en aeronaves de combustibles y lubricantes de aviación. Esta empresa se halla en el municipio de San Roque.

- La **Central de Ciclo Combinado de San Roque II, de Endesa**, se ubica en la margen izquierda del río Guadarranque. La tecnología de generación de los ciclos combinados utiliza combustión de gas natural (turbina de gas) y el vapor que producen los gases de escape (caldera de recuperación y turbina de vapor) para generar electricidad. Estos dos procesos funcionan de manera complementaria, generándose electricidad en dos etapas con una misma fuente de energía, reduciendo así el impacto medioambiental.
- La **Central Térmica de Los Barrios**, perteneciente a E.ON (uno de los mayores proveedores energéticos mundiales), se sitúa en el polígono industrial de Palmones, en el término municipal de Los Barrios. Es una central térmica convencional de carbón, cuyo funcionamiento se basa en el ciclo de Rankine.
- La **Central de Ciclo Combinado Bahía de Algeciras** es una instalación termoelectrica de ciclo combinado. La empresa E.ON es la propietaria de esta central, la cual surge de la reconversión completa de la original central térmica de fuel-gas, que formó parte del Parque de Generación Andaluz entre 1970 y 2007. Está situada en Puente Mayorga, en San Roque.
- **Gas Natural Fenosa** es una de las compañías multinacionales líderes en el sector del gas y la electricidad. La compañía está presente en toda la cadena del valor del gas, a través de la participación en proyectos de exploración, producción, licuefacción y transporte. En San Roque fabrica electricidad con un ciclo combinado de una potencia instalada de 400 MW.
- La **Central de Ciclo Combinado “Campo de Gibraltar”**, pertenece a Nueva Generadora del Sur (NGS), sociedad participada al 50% por Gas Natural Fenosa y CEPSA. La actividad principal de la empresa NGS es la generación de energía eléctrica y vapor mediante la Central de Ciclo Combinado Campo de Gibraltar, ubicada en San Roque (Puente Mayorga). Parte del vapor producido se exporta a la Refinería “Gibraltar- San Roque” de CEPSA.
- La **fábrica de papel TORRASPAPEL S.A.**, formó parte de la AGI hasta el año 2009 que se cerró. Esta fábrica, ubicada en el término de Algeciras, estuvo dedicada a la producción de diversos tipos de papeles, como estucado, de alto brillo, metalizado o adhesivo. No obstante, se incluye en esta relación ya que se encontraba operativa en los años en los que se realizaron los estudios llevados a cabo en este capítulo (2007-2009).

Todas estas empresas nombradas, pertenecientes a la Asociación de Grandes Industrias del Campo de Gibraltar, producen y han producido una gran diversidad de productos. En la actualidad, la producción energética (refino del petróleo y energía eléctrica) son las actividades predominantes, si bien la industria química (tanto orgánica como inorgánica) suministra una gran diversidad de productos a otras industrias. Igualmente, la metalurgia, la industria del papel, el envasado de gas licuado del petróleo y la regasificación de gas natural son otras de las industrias importantes en esta zona [Ferraro-García y col., 2008].

Además de estas industrias localizadas en la zona, existe un gran número de puertos y terminales en Algeciras, La Línea y Gibraltar. Se trata de instalaciones portuarias, de atraque y de almacenamiento que lo configuran como la plataforma logística del sur de Europa. Sus modernas instalaciones, diseñadas para recibir los mayores buques graneleros que actualmente operan en el mundo, permiten la carga, descarga, almacenamiento y trasbordo de todo tipo de graneles sólidos, así como operar con gases y toda clase de mercancías en general.

La elevada concentración de industrias en un espacio tan reducido provoca un efecto acumulativo de emisiones en la zona, la cual se ve agravada por una contaminación medioambiental potencial con posibles efectos negativos sobre el ecosistema acuático y sobre la salud pública [Environmental Safety Group y col., 2009].

En la Tabla IV.A.1 se muestran los compuestos mayoritarios presentes en los vertidos de los distintos tipos de industrias (algunas de ellas ubicadas en la Bahía de Algeciras). Así pues, se observa una gran variedad de contaminantes en función del tipo de industria a la cual pertenecen.

De forma general, los residuos industriales líquidos representan un riesgo potencial para el medio ambiente debido a la carga contaminante que poseen. Esta carga se encuentra agudizada en determinadas industrias, como las químicas, las metalúrgicas, o las papeleras, ya que las sustancias tóxicas presentes en sus vertidos son difícilmente biodegradables y precisan de un tratamiento intenso.

Tabla IV.A.1. Distintos tipos de industrias y sus posibles vertidos líquidos contaminantes [Díaz-Fierros, 2013]

Tipos de industrias	Posibles vertidos contaminantes
Industria de baterías y pilas	Metales pesados (Cd, Pb, Cr, Ni, Hg)
Industria del vidrio	F, Pb
Industrias gráficas e impresión	Hidrocarburos clorados, hidrocarburos aromáticos, Mg, As
Pinturas, barnices y tintas	Hidrocarburos, alcoholes, Pb, Cd, Ba, Cr
Industria maderera	Hidrocarburos aromáticos, fenoles, metales pesados
Industria de la protección de la madera	Hidrocarburos, metales (Cu, Cr, As)
Industria textil	Hidrocarburos, pesticidas, metales, ácidos, álcalis
Empresas de gas	Hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, CN ⁻
Industria petroquímica	Hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd
Refinerías	Hidrocarburos, ácidos, álcalis, asbesto
Industria metalúrgica/galvánica	Hidrocarburos aromáticos, metales pesados, CN ⁻
Metales férricos y acerías	Metales, ácidos, disolventes, hidrocarburos, lodos
Talleres	Hidrocarburos, ácidos, Pb
Curtidos y tenerías	Hidrocarburos, ácidos, metales, disolventes, colorantes
Plásticos	Hidrocarburos, metales, CN ⁻ , aminas, monómeros reactivos
Goma y caucho	Hidrocarburos, ácidos, metales, compuestos de azufre, monómeros reactivos
Industria de transformación	Hidrocarburos, ácidos, metales
Astilleros e industria naval	Hidrocarburos, fenoles, metales, disolventes
Industria papelera	Materia orgánica, Hg, derivados de azufre

Así, los residuos líquidos industriales pueden presentar carga contaminante de tipo inorgánico (metales, complejos o compuestos inorgánicos halogenados), orgánicos (celulosa, compuestos orgánicos azufrados o clorados, hidrocarburos) o una mezcla de ambos tipos. Algunos de estos componentes resultan particularmente difíciles de biodegradar y requieren de un control estricto que asegure su tratamiento antes de ser vertidos al medio receptor.

Además, algunas industrias más específicas (relacionadas con laboratorios de investigación, reactores nucleares o medicina) pueden producir residuos radiactivos, los cuales presentan graves problemas debido tanto a su elevada peligrosidad como a la elevada vida media que la mayoría de ellos presentan. En esta misma línea, existen determinadas emisiones (como emisiones de vapor o líquidos a bajas o altas temperaturas) que, una vez incorporados al medio receptor, provocan en éste un cambio de temperatura con el consiguiente peligro para la flora o la fauna del ecosistema [Seoánez-Calvo y col., 2000b].

Aparte de los residuos industriales líquidos, también son desechados materiales sólidos y se generan gran cantidad de vapores y gases que, con o sin tratamiento previo, son vertidos a la atmósfera. Ambos vertidos pueden llegar a contener una alta carga de contaminantes, dependiendo del tipo de industria y del tratamiento al que hayan sido sometidos.

Aunque todos los residuos industriales deben ser adecuadamente gestionados, desgraciadamente estas medidas de gestión de residuos son incumplidas en multitud de ocasiones, y es la causa de la contaminación y desgaste de los ecosistemas y sus alrededores. Existe la posibilidad de que ciertos vertidos posean alta carga contaminante al ponerse en contacto con el medio receptor, con posibles consecuencias perjudiciales sobre éste.

Este capítulo se centrará en la evaluación de metales pesados, tales como cinc, cadmio, plomo y cobre, ya que son posibles subproductos de las principales industrias situadas en la Bahía de Algeciras, los cuales presentan ciertas características para poder ser considerados como sustancias potencialmente dañinas para este ecosistema acuático.

IV.A.2. Estudios de impacto ambiental realizados en la Bahía de Algeciras en los últimos años

La polémica ambiental siempre ha envuelto esta zona, siendo la Bahía de Algeciras escenario continuo de protestas de grupos ecologistas, los cuales denuncian especialmente el denominado *bunkering*. Éste supone el repostaje de combustible de barco a barco y es la forma habitual de cargar combustible en la zona de la Bahía de Algeciras. Supone una práctica muy peligrosa por la actividad en sí y porque es bastante frecuente que se produzcan descargas de hidrocarburos en estas aguas. Hay que tener en cuenta que el Puerto de Gibraltar es, en la actualidad, el principal abastecedor de combustible de autopropulsión para buques de todo el Mediterráneo, encontrándose el Puerto de Algeciras en segundo lugar. A este hecho, se le une la presencia de "gasolineras flotantes" en las aguas de Gibraltar [del Valle-Gálvez y col., 2006; Environmental Safety Group y col., 2009].

Además de vertidos mediante esta actividad, se han producido en los últimos años accidentes de buques y gabarras destinados al transporte de petróleo y otros combustibles, especialmente con destino a Gibraltar, que se han traducido en vertidos de fuel y otros derivados.

Sin embargo, y a pesar de las causas anteriores, el gran escándalo medioambiental y social se desató a partir de la instalación de varias fábricas y refinerías, como las pertenecientes a "Cepsa" y "Repsol" en esta zona. Las malas prácticas de estas empresas supondrían poner en riesgo los valores naturales de la Bahía, ya que se podrían estar produciendo vertidos de sustancias contaminantes o peligrosas en una zona protegida y sus alrededores. De ahí que se origine una lucha constante por compatibilizar la presencia y producción de las industrias allí instaladas con el buen estado de las aguas de la bahía y todo el ecosistema en general.

Por todos estos motivos, la Bahía de Algeciras ha sido objetivo de diversos estudios científicos, para establecer el impacto de estas contaminaciones. Estos estudios se han ido realizando con mayor frecuencia en los últimos años, debido al aumento de industrias, barcos y vertidos en esta zona. Al mismo tiempo, el desarrollo de nuevas técnicas analíticas de mayor sensibilidad ha facilitado estas investigaciones.

A continuación, se comentan brevemente algunos estudios científicos realizados en la Bahía de Algeciras:

➤ **Estudios generales sobre las condiciones ambientales de la bahía**

- En el año 1997, Estacio y col. estudiaron los efectos de los efluentes orgánicos en el Puerto del Saladillo, situado en la Bahía de Algeciras. La influencia de esta carga orgánica se evaluó a través de medidas de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en las muestras de agua y sedimentos analizadas. Los resultados mostraron un gradiente del nivel de contaminación que disminuía a medida que se alcanzaban las zonas más externas del puerto [Estacio y col., 1997].

- En 2006, otro estudio evaluó la presencia de diversas comunidades intermareales como bioindicadores de las condiciones ambientales en la Bahía de Algeciras. Se encontró una mayor diversidad y riqueza de especies en las zonas exteriores, en comparación con las más interiores. La distribución espacial de determinadas especies intermareales (principalmente moluscos y algas) fue un indicativo de las condiciones fisicoquímicas de la Bahía de Algeciras [Guerra-García y col., 2006].

Ambos trabajos concluyeron que las zonas externas se caracterizaban por un alto hidrodinamismo y oxígeno disuelto, así como baja sedimentación y turbidez; mientras que en las zonas más internas predominaban bajos niveles de hidrodinamismo y gran estancamiento de las aguas. Por lo tanto, estas últimas presentaban un mayor índice de contaminación. Como solución, los autores propusieron el tratamiento de los efluentes de la zona antes de ser vertidos al mar, o bien la canalización de estos vertidos hacia aguas con mayor capacidad de movimiento, haciéndose posible la renovación del agua dentro del propio puerto.

➤ **Estudios de biodisponibilidad metálica en muestras de sedimento**

- Debido al hecho de que la biodisponibilidad de los metales está relacionada con la forma química en la que éstos se encuentran, se han llevado a cabo estudios de especiación. Morillo y col. analizaron, mediante un método secuencial de especiación, la composición de los sedimentos de las Bahías de Cádiz y Algeciras. Además de las fases soluble, reducible, oxidable y residual, se analizó también el contenido metálico total. Según el porcentaje de metal extraído en las fracciones que pueden ser liberadas al medio acuático (es decir, las tres primeras fracciones), los resultados obtenidos proporcionaron el siguiente orden de concentración de metal disponible: Zn > Mn > Pb > Cu > Cd > Ni > Cr > Fe (Bahía de Cádiz); Pb > Zn > Ni > Cu > Mn > Cd > Cr > Fe (Bahía de Algeciras). En ambas bahías los metales Zn, Pb y Ni parecen ser los que presentan una mayor disponibilidad dentro de estos ecosistemas [Morillo y col., 2007].

➤ **Estudios de biodisponibilidad y toxicidad metálica empleando bioindicadores y biomarcadores marinos**

- Han sido varias las publicaciones en las que se ha evaluado la aplicación de especies marinas como posibles bioindicadores de la contaminación presente en un ecosistema. Así, Morales-Caselles y col. compararon sedimentos del Golfo de Cádiz (Bahía de Cádiz y Bahía de Algeciras) con otros de la Costa de Galicia, conocida mundialmente por el famoso derrame de petróleo procedente del "Prestige" (en noviembre de 2002). El estudio se llevó a cabo mediante dos tests de toxicidad (uno de ellos sobre anfípodos). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) resultaron ser los contaminantes principales en la Costa de Galicia y en la Bahía de Algeciras (siendo mayores las concentraciones en esta última, afectada por una contaminación de tipo crónico). Además, metales pesados como Ni y Hg sobrepasaron algunos valores guía de contaminación internacionales [Morales-Caselles y col., 2007].

Estos mismos autores compararon posteriormente la calidad de muestras de sedimentos procedentes de la Bahía de Algeciras y de la costa de Galicia, ambas zonas afectadas por vertidos de aceite, mediante un método basado en la ponderación de pruebas y datos. Se determinó un gran conjunto de parámetros mediante cuatro tipos de pruebas: contaminación de los sedimentos, efectos biológicos y bioacumulación bajo condiciones de laboratorio (mediante medidas de marcadores biológicos), toxicidad bajo condiciones climáticas o de campo y estudio de la estructura de la comunidad bentónica [Morales-Caselles y col., 2008a].

Estos dos estudios demostraron que era de mayor magnitud el impacto medioambiental derivado de una contaminación crónica (continua) por vertidos químicos, que el causado por un suceso puntual (contaminación aguda).

- En la misma línea, Cesar y col. compararon la contaminación medioambiental en diferentes áreas del sur de España (Bahía de Cádiz, Bahía de Algeciras y Ría de Huelva) y Brasil (estuarios de Santos y São Vicente). Mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA) se relacionó la toxicidad de los sedimentos (mortalidad de anfípodos) con los datos físico-químicos (concentraciones de Zn, Cd, Pb, Cu, Ni, Co, V, PCBs, PAHs, contenidos en carbono orgánico y partículas finas), obteniéndose contaminación por PAHs y metales pesados (sobrepasándose los niveles guía para Cu, Zn y Ni) en algunas zonas de la Bahía de Algeciras [Cesar y col., 2007].

- El crustáceo marino *Balanus amphitrite* fue propuesto por Morillo y col. como vigilante biológico (bioindicador) de la posible contaminación que podían producir ciertos metales de interés medioambiental en la Bahía de Algeciras y en un estuario de Huelva, estando ambas áreas bastante industrializadas. En la Bahía de Algeciras se

observó una correlación significativa entre las concentraciones metálicas de Cu, Mn, Ni y Zn encontradas en el crustáceo *B. amphitrite*, y las concentraciones existentes en la fracción disuelta de las muestras de agua que se tomaron junto con los crustáceos [Morillo y Usero, 2008].

- El gamárido *Hyale schmidtii* y el caprélido *Caprella penantis* (taxones más dominantes en las comunidades intermareales y aguas someras o poco profundas de la Bahía de Algeciras) fueron investigados por Guerra-García y col. Estos anfípodos acumulan metales pesados, que son transferidos a lo largo de la cadena trófica en ecosistemas marinos. Las medidas de concentraciones de metales pesados en muestras de agua se encontraron todas por debajo del límite de detección de la técnica empleada (ICP-OES), mientras que metales como Cu, Fe, Mn, Ni y Zn se concentraron y acumularon en las especies propuestas, siendo estas concentraciones mayores en las zonas internas que en las externas [Guerra-García y col., 2009].

- La especie *Caprella* (crustáceo anfípodo) también fue empleada por Guerra-García y col. para el monitoreo de la contaminación existente en esta bahía. Se determinó la concentración de metales pesados en esta especie (en un total de 18 estaciones) y se comparó con otras especies de crustáceos peracáridos (gamáridos, isópodos y tanaidáceos) y moluscos. Los caprélidos resultaron ser los más adecuados para su empleo como bioindicadores de contaminación metálica, presentando rangos de concentraciones realmente amplios para Cr, Fe, Hg, Ni y Zn [Guerra-García y col., 2010].

- Ramos-Gómez y col. realizaron estudios de toxicidad aguda sobre el anfípodo *Ampelisca brevicornis*, especie anteriormente validada como indicador [Riba y col., 2003, 2004; Casado-Martínez y col., 2006, 2007; Morales-Caselles y col., 2008b]. Estas especies fueron sometidas a una exposición (durante 10 días) frente a los distintos sedimentos tomados de la Bahía de Algeciras, Bahía de Santander, Las Palmas de Gran Canaria y la Ría de Huelva. Además, los sedimentos fueron caracterizados físico-químicamente (carbono orgánico, contenido de finos, Zn, Cd, Pb, Cu, Ni, Co y Hg, PAHs y PCBs). A partir de los resultados, se detectaron efectos tóxicos relacionados con metales como Ni y Co en la Bahía de Algeciras [Ramos-Gómez y col., 2009].

- Araújo y col. estudiaron la inhibición del crecimiento de la microalga bentónica *Cylindrotheca closteriu* y la inhibición de la fecundidad del copépodo harpacticoide *Tisbe battagliai*, ambas especies previamente aplicadas en ensayos de toxicidad [Araújo y col., 2009]. Estas especies se expusieron a sedimentos contaminados de la Ría de Huelva, el estuario del Guadalquivir y la Bahía de Algeciras y se estudiaron sus efectos. La especie *T. battagliai* resultó ser la más sensible, probablemente debido a la relación específica de la especie con el sedimento (contacto físico e ingestión de partículas). Los

sedimentos más contaminados resultaron ser los de la Ría de Huelva, considerándose la Bahía de Algeciras como una zona moderadamente afectada [Araújo y col., 2010].

- Analizándose la actividad bioquímica de una serie de biomarcadores y enzimas en el poliqueto *Arenicola marina*, tras ser expuesto a distintos tipos de sedimentos, se consiguió evaluar la calidad de éstos, los cuales procedían de la Bahía de Cádiz, Puerto de Las Palmas de Gran Canaria, Bahía de Santander, Bahía de Algeciras y Estuario de Huelva. La modificación de la actividad enzimática estuvo influenciada por la concentración de metales y de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Mediante estos estudios se consiguió validar el empleo del poliqueto *A. marina* y los biomarcadores utilizados en el estudio, como una buena herramienta para el estudio de los contaminantes biodisponibles presentes en los sedimentos [Ramos-Gómez y col., 2011].

➤ **Otros estudios en la bahía**

- Rojo-Nieto y col. estudiaron la concentración de PAHs en un elevado número de muestras de sedimentos superficiales, pero localizados a diferentes profundidades. Mediante análisis multivariante definieron la Bahía de Algeciras en cinco zonas diferenciadas, dependiendo de los niveles y fuentes de contaminación [Rojo-Nieto y col., 2011].

- Sánchez de la Campa y col. recurrieron al estudio del rango de tamaño y composición química de la materia particulada metalífera, presente en los compuestos petroquímicos de las emisiones de las chimeneas de refinerías de petróleo situadas en San Roque, Algeciras. Las muestras fueron recogidas de forma directa desde el interior de las chimeneas. Para la determinación emplearon la microscopía electrónica de barrido (SEM), viendo que la mayor parte del metal presente en la materia particulada estaba concentrado en la fracción más fina, entendiendo que este hecho pudiera estar relacionado con el inquietante índice de mortalidad de estas zonas [Sánchez de la Campa y col., 2011].

- Dado que los ecosistemas acuáticos pueden llegar a presentar ciertos niveles de radioactividad derivados de actividades antropogénicas, estos autores centraron su estudio en este tema. Tras medir y analizar las concentraciones de actividad de los isótopos ^{226}Ra , ^{232}Th y ^{40}K (mediante espectrometría gamma) en sedimentos marinos, se determinó que la Bahía de Algeciras mostraba bajos niveles de radioactividad, descartando cualquier posible riesgo por este motivo [González-Fernández y col., 2012].

- El último trabajo a comentar, se centró en un modelo numérico para estudiar el comportamiento de los contaminantes Zn, Cu y Ni en la Bahía de Algeciras. El modelo se encuentra integrado por un módulo hidrodinámico, otro que explica el transporte de sedimentos y la materia particulada y, por último, otro referente a la dispersión de los contaminantes. El modelo fue bastante satisfactorio respecto a las condiciones reales, mostrando un transporte débil dentro de la bahía. Los contaminantes se encontraban próximos a sus fuentes de emisión y los gradientes de concentración indicaban una escasa mezcla de las masas de agua [Periáñez, 2012].

Después de esta revisión, se puede concluir que, si bien esta zona problemática constituye un área de interés científico por sus fuentes de contaminación, no existen muchas publicaciones científicas que abarquen estudios conjuntos de contaminación metálica en aguas, sedimentos y peces, así como las correlaciones existentes entre dichos compartimentos ambientales. Por ello, los estudios llevados a cabo en este capítulo adquieren un gran interés.

IV.A.3. Metales estudiados en la Bahía de Algeciras

Los metales seleccionados son metales representativos de la contaminación metálica de la zona y pueden clasificarse en dos grupos: el primero engloba a los denominados metales esenciales, los cuales son necesarios para el organismo pero tanto un defecto como un exceso puede resultar perjudicial para el organismo. En este grupo se encuentran el Zn y el Cu. El segundo grupo, está formado por metales pesados que no presentan una función biológica o metabólica conocida y son tóxicos incluso a bajas concentraciones, como el Cd y el Pb.

A continuación se exponen más detalladamente los cuatro metales en los que se han centrado los estudios descritos en el presente capítulo.

IV.A.3.1. Cinc

De forma natural, este metal puede encontrarse en minerales como la blenda o esfalerita (sulfuro de cinc, ZnS) y la calamina o smithsonita (carbonato de cinc, $ZnCO_3$). Como consecuencia de la erosión de rocas y suelos, y mediante la acción del viento o lluvia, este metal puede llegar hasta ríos, lagos o mares, donde puede seguir su transporte, acumularse en la biota o pasar a formar parte de los sedimentos (donde generalmente se asocia con óxidos de hierro y manganeso). A estas concentraciones

naturales se les suman las producidas por las actividades antropogénicas (principalmente efluentes industriales, actividades mineras, geológicas y fuentes difusas).

En la industria, el cinc y sus aleaciones son ampliamente usados en una gran variedad de aplicaciones. Destacan en procesos industriales como fundición, forja, laminado o extrusión. Una de las aplicaciones más importante es como revestimiento para proteger los aceros frente a la corrosión (galvanización) con el fin de fabricar materiales más duraderos (pudiendo reciclarse finalmente y ser recuperado conservando sus propiedades originales) [Panagopoulos y col., 2013]. Gran parte de las emisiones de Zn proceden también de actividades industriales como la minería o la combustión de carbón y residuos.

Además, compuestos binarios del Zn como ZnO y ZnS son muy importantes y tienen grandes aplicaciones en la industria. Por ejemplo, el ZnO es utilizado como acelerador en la vulcanización del caucho, como pigmento o como aditivo para mejorar la resistencia química de determinados tipos de cristal. El ZnS es una sal con propiedades fluorescentes, la cual se emplea en importantes aplicaciones tecnológicas en una amplia gama de dispositivos optoelectrónicos. Dentro de los haluros que puede formar este metal, destaca el ZnCl_2 con aplicación en procesos textiles, disolventes de óxidos y catalizador en síntesis orgánicas.

El cinc es siempre divalente en sus compuestos, excepto en algunos casos en los que puede unirse a otros metales para formar aleaciones de cinc.

Como sales, puede constituir nitratos, cloratos, sulfatos, cromatos, etc. Por lo general, las sales de cinc en medio acuoso suelen encontrarse totalmente disociadas.

Puede encontrarse formando parte de un gran número de compuestos de coordinación, donde el cinc constituye el ión central rodeado por cuatro ligandos que se disponen en forma de tetraedro. Asimismo, puede formar compuestos organometálicos con aplicación en reacciones de química orgánica.

Desde un punto de vista químico es un metal bastante activo. Además, presenta un carácter anfótero: el cinc metálico en disoluciones ácidas reacciona liberando hidrógeno e iones cinc, Zn^{2+} , pudiendo disolverse también en disoluciones fuertemente alcalinas para formar iones de tetrahidroxocincatos, $\text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}$ [Greenwood y Earnshaw, 2005].

El Zn presente en el agua del mar tiene una gran tendencia a adsorberse sobre partículas o formar complejos con la materia orgánica disuelta. Por tanto, la mayoría del Zn se presenta formando complejos, siendo minoritaria la forma iónica disuelta Zn^{2+} . En sedimentos, la distribución de Zn varía ampliamente, encontrándose generalmente asociado a la fracción residual, así como a óxidos de hierro y manganeso y materia orgánica y sulfhídrica [Neff, 2002].

El Zn es un componente esencial de la enzima anhidrasa carbónica que permite al fitoplancton convertir el HCO_3^- presente en el agua en CO_2 , necesario para la fotosíntesis. Cuando en las aguas superficiales se encuentran bajas concentraciones de Zn, éstas pueden limitar el crecimiento del fitoplancton en los ecosistemas acuáticos. Además, el Zn actúa como cofactor de la alcalina fosfatasa, la cual permite al fitoplancton la extracción de fósforo a partir de las formas orgánicas disueltas en aguas con bajo contenido en fósforo. Al igual que el Fe, la concentración de Zn en el mar aumenta con la profundidad y suele correlacionarse con la concentración de elementos como el N, P y Si, lo cual parece indicar que son los procesos biológicos unos de los principales controladores de la distribución de estos elementos en aguas marinas [Schlesinger y Bernhardt, 2013].

Se considera un micronutriente esencial en varias funciones involucradas en el desarrollo biológico de los peces. Sin embargo, una concentración excesiva de este metal puede resultar tóxica para éstos, con consecuencias sobre el crecimiento, cambios histológicos en branquias e hígado, bioacumulación y producción de especies reactivas de oxígeno, entre otros efectos. El hígado juega un papel principal en el metabolismo de los lípidos, el cual actúa como principal órgano de bioacumulación de Zn en peces [Zheng y col., 2013c].

El cinc es un elemento esencial para el organismo. Es considerado un componente integral en la estructura de más de 300 enzimas, las cuales están implicadas en procesos biológicos, tales como catálisis enzimática, regulación redox, transducción de señales celulares, neuronas y sistema inmunológico. Niveles deficientes de este metal pueden ocasionar retardo en el crecimiento y desarrollo de los niños, retardo en el desarrollo genital e hipogonadismo, dermatitis y retraso en la cicatrización de heridas, alopecia, embarazos o partos con complicaciones y disminución de la función inmunológica en organismos, entre otros efectos adversos. Además, la correcta absorción de este metal disminuye con la edad, como han demostrado estudios científicos realizados en personas de edad avanzada [Haase y col., 2008; Franz y col., 2013]. Por otro lado, un exceso de éste (hipercincemia) también puede llevar asociados efectos perjudiciales y alteraciones en el ser humano.

Aunque no se considera uno de los elementos más tóxicos en los seres humanos, en los peces ocurre lo contrario. Tiende a formar compuestos insolubles con la mucosa presente en las branquias, dificultando la respiración de éstos [Greenwood y Earnshaw, 2005; Sandstead y Au, 2007].

IV.A.3.2. Cadmio

Como fuente natural, se encuentra formando parte de un sulfuro de cadmio (CdS) en el mineral greenockita. También suele sustituir al cinc en sus minerales, debido a su parecido químico, pudiendo separarse de éste mediante precipitación con sulfatos o destilación. No obstante, casi todo el cadmio producido suele obtenerse como subproducto de la minería y metalurgia de sulfuros de cinc y en menor medida, de los de plomo y cobre.

Respecto a los usos del cadmio, aproximadamente un 67% del total producido se emplea en la fabricación de baterías, siendo las de níquel-cadmio las más frecuentes. Un 7% se emplea en galvanoplastia como recubrimiento. Otra parte más minoritaria se encuentra formando parte de otros compuestos, los cuales se emplean como constituyentes de pigmentos, aleaciones, soldaduras, semiconductores, estabilizantes de plástico en el PVC y formando parte de algunos tipos de fertilizantes [Greenwood y Earnshaw, 2005; Rayner-Canham y Overton, 2003].

La verdadera preocupación radica en los niveles de Cd emitidos por fuentes industriales, los cuales pueden entrar en contacto con los ecosistemas acuáticos en forma de agua residual, y alterar así el estado natural de éstos.

Su estado de oxidación más común es el +2, pudiendo presentar el estado +1, más inestable. Los principales compuestos de cadmio que aparecen bajo condiciones oxidantes son CdO , CdCO_3 y $\text{Cd}_3(\text{PO}_4)_2$, siendo el sulfuro de cadmio (CdS) el más abundante bajo condiciones reductoras.

A bajos valores de pH predomina la especie iónica Cd^{2+} , existiendo otras especies oxoaniónicas a pH elevado.

El cadmio presente en el agua de mar puede encontrarse en distintas formas (sólidas o en disolución). En disolución, las especies dominantes son CdCl^+ , CdCl_2 y CdCl_3^- . El cadmio como especie iónica Cd^{2+} es la forma más tóxica del cadmio y raramente representa más del 3% del cadmio total disuelto en agua de mar. Debido a la complejación de este metal por el ión cloruro, existe una relación inversa entre la

salinidad el agua y la fracción del cadmio total disuelto que se encuentra en el estado de ión libre. Otra fracción suele presentarse asociada a materia orgánica coloidal. Esta afinidad del cadmio por la materia orgánica coloidal es mucho menor que en el caso del cobre y plomo. El cadmio no presenta una fuerte afinidad por adsorberse sobre ácidos húmicos y fúlvicos, sino que más bien lo hace sobre partículas fácilmente intercambiables. De esta forma, el cadmio presenta una gran capacidad de desorción y biodisponibilidad dentro del medio acuático.

En los sedimentos que se encuentran sometidos a ambientes óxicos, el cadmio se asocia principalmente con los carbonatos y óxidos de hierro y manganeso. Mucho del cadmio de esta fracción es fácilmente intercambiable y soluble en agua. La mayoría del cadmio restante se encuentra asociado a la fracción compuesta por materia orgánica y sulfuros. En general, el cadmio asociado a los sedimentos marinos oxidados es moderadamente móvil, por lo que supone una amenaza constante en los ecosistemas acuáticos.

En los ambientes anóxicos, el cadmio parece estar asociado con carbonatos, sustancias húmicas insolubles y sulfuros. Generalmente, bajo estas condiciones, el cadmio forma complejos fuertes con los sulfuros [Neff, 2002].

En especies como peces, mejillones, ostras, gambas y otros mariscos pueden bioacumularse concentraciones de cadmio. Se estima que las especies de agua salada son más resistentes a este metal que las de agua dulce. No obstante, una vez esté presente en el medio marino puede transferirse rápida y fácilmente a los seres humanos, produciendo riesgos y daños para la salud [Ju y col., 2012].

En cuanto a su toxicidad es similar a la del mercurio. El cadmio es un elemento tóxico al que el ser humano está expuesto continuamente a través de la alimentación, ya que puede encontrarse en los alimentos a niveles cercanos a los máximos recomendados. Además, este metal se encuentra presente en el humo del tabaco. Las vías respiratorias son la principal ruta de entrada de este elemento en los seres humanos y entre el 50-95% del Cd inhalado entra en el sistema circulatorio. Aunque este metal puede ser eliminado de la sangre, tiende a acumularse en los riñones y en el hígado. En consecuencia, pequeñas ingestas prolongadas en el tiempo pueden causar daños severos en los riñones [Miranda y col., 2012]. También puede causar daños en los huesos y corazón, además de desórdenes reproductivos [Gwaltney-Brant, 2013].

IV.A.3.3. Plomo

Este metal raramente se encuentra en su estado fundamental, siendo la galena el mineral más explotado para su obtención. La galena (PbS) es un sólido denso de color gris oscuro que pertenece al grupo de los sulfuros, el cual, además de plomo, puede presentar cantidades variables de impurezas.

El plomo puede presentar dos estados de oxidación, +4 y +2. No obstante, la mayoría de los compuestos inorgánicos de plomo están asociados a su estado de oxidación Pb(II) , mientras que los compuestos de Pb(IV) suelen ser menos frecuentes y son, en su mayoría, agentes oxidantes fuertes [Casas y col., 2006]. Químicamente, este metal puede encontrarse formando parte de sales, óxidos y compuestos organometálicos. Dentro de los óxidos, la forma más estable es el PbO , donde el Pb presenta el estado de oxidación +2. No obstante, el Pb (IV) también puede formar PbO_2 , el cual es también bastante estable y un buen agente oxidante.

Este metal es relativamente resistente al ataque de los ácidos sulfúrico y clorhídrico, aunque se disuelve con lentitud en ácido nítrico y ante la presencia de bases nitrogenadas. Esta resistencia se debe principalmente a una capa protectora de óxido que el propio plomo forma en su superficie. Esta característica hace que el plomo sea ampliamente aplicado en la construcción y en la fabricación y manejo de ácido sulfúrico.

Entre las principales aplicaciones del plomo destacan la fabricación de baterías, revestimiento de cables eléctricos, redes de tuberías, tanques y aparatos de rayos X. Debido a su elevada densidad y propiedades nucleares puede emplearse como blindaje protector de materiales radiactivos. Numerosas aleaciones son empleadas en soldaduras, metal tipográfico o cojinetes metálicos. Por último, ha sido extensamente empleado en forma de compuesto en numerosos pigmentos y pinturas y como aditivo en las gasolinas (en forma de tetraetil plomo) [Greenwood y Earnshaw, 2005].

En agua de mar, bajo condiciones normales de pH y salinidad, el plomo se encuentra principalmente formando parte de especies inorgánicas como carbonatos (PbCO_3), cloruros (PbCl_n) e hidróxidos (PbOH_n). Por lo general, menos del 5% del plomo inorgánico en agua de mar está en forma de ión libre (Pb^{2+}). En sedimentos anóxicos, el plomo divalente reacciona con los sulfuros inorgánicos formando predominantemente sulfuros de plomo (PbS) insolubles [Neff, 2002].

El plomo, a determinados niveles de concentración, puede producir envenenamiento, siendo especialmente alarmante en niños. Éste constituye el principal problema de salud en los países industrializados, pudiendo producir trastornos neurológicos (disfunción cognitiva, retardo mental, síndrome de déficit de atención, encefalopatía), sordera, ceguera, enfermedades cardiovasculares, daños renales y deficiencia en el desarrollo físico. Además interfiere con la síntesis de hemoglobina, por lo que indirectamente puede causar anemia [Ernst, 2012; Gwaltney-Brant, 2013].

El plomo que entra en el cuerpo humano queda allí almacenado. Así, la vida media en los huesos de este metal es de aproximadamente 25 años, por lo que constituye un problema a muy largo plazo [Pemmer y col., 2013].

Tanto el plomo como sus compuestos son generalmente contaminantes tóxicos. Las sales de plomo II y los compuestos orgánicos del plomo son dañinos desde un punto de vista toxicológico, al igual que otros compuestos como el acetato de plomo, óxido de plomo, nitrato de plomo y carbonato de plomo.

IV.A.3.4. Cobre

El cobre es un metal de color amarillo, que en gran número de ocasiones puede presentar una coloración rojiza debido a que puede encontrarse recubierto por una capa de óxido de cobre (I). Presenta dos estados de oxidación (+1 y +2), siendo el más común el Cu (II).

Aunque el cobre no se encuentra abundantemente en la naturaleza, existen varios minerales que lo contienen. El más común es el sulfuro de cobre férrico (CuFeS_2), un sólido metálico con el nombre mineralógico de calcopirita o pirita de cobre. Otro mineral, algo menos frecuente, es el $\text{CuAl}_6(\text{PO}_4)_4(\text{OH})_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, que químicamente es un fosfato hidratado de cobre y aluminio. Se conoce por el nombre de turquesa y puede presentar desde colores azules hasta verdes amarillentos, en función de la proporción de hierro que suele sustituir al aluminio en su estructura. Cuando esta sustitución del Al^{3+} por Fe^{3+} se produce de forma completa, este mineral pasa a denominarse calcosiderita [Greenwood y Earnshaw, 2005].

Tanto el Cu (I) como el Cu (II) pueden formar compuestos, pero es el estado de oxidación +2 el que domina la química de este metal en estado acuoso. En disolución, casi todas las sales que forma el Cu (II) son azules, debido a la presencia del ión hexacoordinado $[\text{Cu}(\text{OH}_2)_6]^{2+}$. La única excepción se encuentra en el caso de disoluciones concentradas de cloruro de cobre, las cuales presentan color verde. Esta coloración es consecuencia de la formación de complejos con geometría casi plana, como en el caso

del ión $[\text{CuCl}_4]^{2-}$. No obstante, cuando estas disoluciones son diluidas viran de nuevo a color azul, ya que las moléculas de agua sustituyen sucesivamente a los iones cloruros y finalmente vuelve a formarse el complejo acuoso $[\text{Cu}(\text{OH}_2)_6]^{2+}$ [Greenwood y Earnshaw, 2005].

El Cu puede presentarse en diversas formas en el agua de mar. Las formas inorgánicas más abundantes (a los valores de pH y composición iónica del agua de mar) son CuCO_3 , distintos complejos clorados, y $\text{Cu}(\text{OH})_2$, éste último en forma de precipitado microparticulado. Generalmente, el Cu iónico libre (Cu^{2+}) representa menos del 5% del contenido inorgánico total disuelto en agua de mar. Además, el Cu presenta una gran afinidad por formar complejos con ligandos orgánicos como las sustancias húmicas y la materia orgánica disuelta. Los microorganismos marinos y algas producen ligandos orgánicos que favorecen el proceso de complejación y desactivación de la toxicidad asociada al Cu en su forma libre.

En sedimentos con bajo contenido en materia orgánico, la mayoría del Cu se encuentra en la fracción residual asociado a la estructura mineral de éstos. En cambio, en el caso de sedimentos con altas concentraciones de materia orgánica, el cobre se encuentra fundamentalmente asociado a la fracción orgánica/sulfhídrica o carbonatos. Mucho del cobre restante, puede hallarse asociado a los óxidos de hierro y manganeso. Por otro lado, en sedimentos anóxicos, el cobre tiende a formar complejos estables con sulfuros, los cuales pueden ser solubles o insolubles (en función del complejo formado con el sulfuro) [Neff, 2002].

Se estima que el cobre es el tercer metal de transición más importante desde un punto de vista biológico, después de hierro y cinc. Constituye un elemento traza esencial y vital para la vida y el crecimiento del organismo. Debido a su actividad redox, es un componente fundamental en muchas enzimas y proteínas [Duncan y White, 2012]. Deficiencias o excesos de Cu han sido asociados a patologías hereditarias como las enfermedades de Menkes y de Wilson, respectivamente. La enfermedad de Wilson se caracteriza por una acumulación de cobre en el cerebro, ojos e hígado, principalmente. Esta enfermedad puede tratarse mediante el empleo de agentes quelatantes que puedan formar complejos con el cobre y así ser excretados de forma inofensiva [El Balkhi y col., 2011]. La toxicidad por un exceso de este metal también ha fomentado otras enfermedades como hepatitis, cirrosis, toxicosis idiopática, mal funcionamiento de riñones y enfermedades neurodegenerativas (particularmente Alzheimer y Parkinson) [Pal, 2014].

Como el hierro, el cobre está implicado activamente en la síntesis de la hemoglobina, por lo que la deficiencia de éste puede provocar una baja tasa de formación de hemoglobina, anemia, neutropenia, desmineralización ósea y detención

del crecimiento. Además, el cobre es fundamental para el desarrollo y mantenimiento de los huesos y tejido elástico como tendones y tejido conectivo, así como del sistema vascular [Sanz-París y col., 2006].

IV.A.4. Naturaleza de las muestras

IV.A.4.1. Aguas

La Orden de 14 de Febrero de 1997 (BOJA nº 27, de 04/03/1997), en desarrollo del Decreto 14/1996 (BOJA nº19, de 08/02/1996), clasificaba las aguas litorales andaluzas en cuatro tipos de aguas, según sus características y necesidad de conservación y protección: aguas especiales, aguas limitadas, aguas normales y aguas menos limitadas, y establecía los objetivos de calidad (en el Anexo II de esta orden) de las aguas afectadas directamente por los vertidos.

Posteriormente, al objeto de establecer las limitaciones de vertidos contaminantes, los objetivos de calidad de las aguas litorales afectadas directamente por los mismos y el canon de vertidos, las aguas litorales andaluzas fueron clasificadas en base a la normativa aplicable de la Junta de Andalucía: el Decreto 204/2005 (BOJA nº208, de 25/10/2005), que tiene por objeto la revisión de las declaraciones de zonas sensibles y menos sensibles en las aguas del litoral y de las cuencas hidrográficas intracomunitarias de la Comunidad Autónoma de Andalucía efectuadas por el Decreto 54/1999 (BOJA nº35, de 23/03/1999), de conformidad con lo dispuesto en el Real Decreto 509/1996 (BOE nº77, de 29/03/1996) y el Real Decreto-Ley 11/1995 (BOE nº312, de 30/12/1995). Según el citado texto, se definen dos grupos de ecosistemas acuáticos: zonas sensibles y zonas normales.

- Zonas sensibles:

Se consideran como zonas sensibles aquellos medios acuáticos superficiales que teniendo un intercambio de aguas escaso o que recibiendo nutrientes, sean eutróficos o puedan llegar a serlo en un futuro próximo si no se adoptan medidas de protección, así como las aguas dulces de superficie destinadas a la obtención de agua potable, que podrían contener una concentración de nitratos superior a la que establecen las disposiciones vigentes para este tipo de aguas si no se tomasen medidas de protección.

- Zonas normales:

Se consideran zonas normales aquellos medios acuáticos superficiales no definidos como sensibles.

Según este Decreto, se consideran las aguas litorales de la Bahía de Algeciras como zonas normales.

El Anexo II de la Orden de 14 de Febrero de 1997 muestra los objetivos de calidad de las aguas litorales afectadas directamente por vertidos contaminantes, donde los principales parámetros de interés se muestran en la Tabla IV.A.2. En dicha tabla se han subrayado los valores que no deben sobrepasar las concentraciones de Zn, Cd, Pb y Cu en estas aguas.

Tabla IV.A.2. Objetivos de calidad definidos para los distintos tipos de aguas (Anexo II, Orden de 14 Febrero de 1997, en desarrollo del Decreto 14/1996)

Parámetros	Valor imperativo			
	Aguas especiales	Aguas limitadas	Aguas normales	Aguas menos limitadas
pH	7-9	6-9	6-9	6-9
COT (mg L ⁻¹)	2	5	3	3
Nitratos (µg L ⁻¹)	700	1400	1000	1000
Nitritos (µg L ⁻¹)	600	1000	600	600
Amonio (µg L ⁻¹)	600	1200	1000	1000
Fósforo total (µg L ⁻¹)	600	800	600	600
Cianuros (µg L ⁻¹)	5	10	5	5
Fenoles (µg L ⁻¹)	20	50	30	30
Arsénico (µg L ⁻¹)	25	50	25	25
Cinc (µg L ⁻¹)	60	80	60	60
Cadmio (µg L ⁻¹)	2,5	5	2,5	2,5
Plomo (µg L ⁻¹)	10	20	10	10
Cobre (µg L ⁻¹)	20	40	20	20
Níquel (µg L ⁻¹)	25	50	25	25
Cromo total (µg L ⁻¹)	10	20	10	10
Mercurio total (µg L ⁻¹)	0,3	0,5	0,3	0,3
PAHs (ng L ⁻¹)	200	200	200	200

IV.A.4.2. Sedimentos

La fase disuelta (también denominada fase filtrable) de un ecosistema acuático la constituyen aquellas partículas que poseen un diámetro inferior a 0,45 μm . Éstas están constituidas generalmente por iones libres, complejos coloidales o complejos orgánicos, entre otros.

Se entiende por partículas en suspensión aquellos sólidos presentes en el agua cuyos tamaños varían de 0,45 a 63 μm . Estas partículas pueden ser bióticas (fitoplancton, bacterias o algas) o abióticas (partículas inorgánicas u orgánicas). La fracción abiótica procede, en su mayor parte, de erosión de rocas y suelos. Como consecuencia los compuestos más comunes son arcilla, sílice, óxidos de Fe y Mn, carbonatos, sulfuros, ligandos de otros minerales y materia orgánica (fundamentalmente sustancias húmicas).

Cuando la materia en el seno de un líquido pasa a formar parte del fondo marino, debido a su mayor densidad respecto a la de ese líquido, se denomina **sedimento**. La sedimentación puede producirse mediante un proceso de decantación o bien por precipitación química. Hay que indicar que los sedimentos no poseen las mismas características que el material originario del cual proceden, debido a que la fracción mineral más gruesa se irá depositando por decantación a lo largo de su transporte. Otro suceso muy común es la transformación de unos minerales en otros durante el trayecto.

Los sedimentos tienden a depositarse en el fondo marino formando capas, por lo que un estudio de éstos contiene información sobre los cambios medioambientales que se han ido produciendo en el tiempo. Estos estudios cobran más interés aún en la actualidad, ya que pueden revelar la influencia de determinadas industrias u otras fuentes de contaminación en una determinada zona [Montgomery y col., 2000]. Los sedimentos pueden presentar diversos orígenes, entre los que destacan los siguientes:

- *Detríticos*: procedentes de la meteorización de rocas, llegan hasta los mares y otros ecosistemas acuáticos mediante la acción de agentes externos como lluvia o viento. Aportan fundamentalmente partículas de cuarzo y aluminosilicatos (como arcillas, feldespatos y micas).
- *Biogénicos*: materia orgánica de la degradación de organismos muertos o restos inorgánicos de esqueletos de éstos.
- *Endogénicos*: compuestos que se absorben, adsorben o precipitan sobre los sedimentos. Estos procesos van a depender de los cambios en las condiciones

del medio (pH, temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, potencial redox, etc.).
Forman parte de esto grupo óxidos, hidróxidos, carbonatos, sulfuros, complejos...

Además, los sedimentos pueden clasificarse según su granulometría o tamaño de grano. En la Tabla IV.A.3 se muestra un esquema de esta clasificación con los distintos tipos de sedimento en función de su rango de tamaño, según la norma alemana DIN 4022.

Tabla IV.A.3. Clasificación de rocas sedimentarias por su tamaño de grano según la norma DIN 4022

Tipos de sedimentos	TAMAÑO DE GRANO	
PIEDRA / BLOQUE	> 60 mm	
GRAVA	FRACCIÓN GRUESA	> 20 - 60 mm
	FRACCIÓN MEDIANA	> 6 - 20 mm
	FRACCIÓN FINA	> 2 - 6 mm
ARENA	FRACCIÓN GRUESA	> 0,6 - 2 mm
	FRACCIÓN MEDIANA	> 0,2 - 0,6 mm
	FRACCIÓN FINA	> 0,06 - 0,2 mm
LIMO	FRACCIÓN GRUESA	> 0,02 - 0,06 mm
	FRACCIÓN MEDIANA	> 0,006 - 0,02 mm
	FRACCIÓN FINA	> 0,002 - 0,006 mm
ARCILLA	< 0,002 mm	

El estudio de concentraciones metálicas presentes en muestras de sedimentos es importante, ya que éstos constituyen el último destino de muchos metales de interés medio ambiental que se introducen en el ecosistema, y proporcionan una estimación bastante fiable sobre la contaminación que sufre o ha sufrido la zona por estos contaminantes. Igualmente, es de destacar que pueden volver a formar parte de la columna de agua por redisolución o resuspensión debido a las mareas, acciones de organismos o variaciones de parámetros físico-químicos (como pH y producto de solubilidad). Además, dependiendo del estado y la forma química en que se encuentren, los metales podrán resultar ser más o menos tóxicos. Generalmente, los metales presentan una mayor toxicidad cuando se encuentran como iones libres, sin obviar que existen determinados complejos orgánicos de metales que pueden presentar una toxicidad mayor que la del ión libre. Los menos tóxicos resultan ser aquellos que forman parte de sólidos orgánicos o sólidos precipitados, y los que se encuentran en minerales que constituyen partículas sólidas.

Conviene resaltar que los metales no se encuentran homogéneamente distribuidos en las diferentes fracciones granulométricas, sino que por el contrario, suelen concentrarse en las fracciones más finas de los sedimentos [Lin y col., 2003]. De esta manera, dos muestras próximas pero de distinta granulometría no serían comparables. Para ello, el método de normalización recomendado en estudios de sedimentos y dragados consiste en analizar las fracciones de sedimento de tamaño inferior a 63 μm [CEDEX, 1994].

La necesidad de una adecuada gestión del control ambiental hace que sean numerosas las Guías sobre la Calidad de los Sedimentos (en inglés SQGs, "Sediment Quality Guidelines") que han sido elaboradas. El objetivo de estas guías se centra en la protección de los ecosistemas acuáticos, prediciendo los efectos adversos que los contaminantes presentes en los sedimentos pueden causar sobre la biota marina (fundamentalmente sobre organismos bentónicos). Por lo tanto, estas guías permiten evaluar la calidad de un determinado sedimento mediante comparación con unos valores de referencia establecidos [McCauley y col., 2000].

En los últimos años se han ido desarrollando y estableciendo diversos criterios en relación a la calidad de sedimentos. Así, en la Tabla IV.A.4 se muestran los diversos valores de referencia para los metales estudiados: valores naturales en esquistos (considerados como sedimentos no contaminados), valores guía para la protección de la vida acuática (ISQG y PEL) y los niveles NS&T de la National Oceanic and Atmospheric Administration (N.O.A.A.) con efectos biológicos (ERL y ERM). El valor ISQG (Interim Sediment Quality Guidelines) es el valor guía de calidad del sedimento, es decir, la concentración por debajo de la cual no se espera efectos biológicos adversos. El nivel PEL (Probable Effect Level) presenta el umbral con efectos probables sobre la vida acuática. El rango bajo de efectos (Effect Range-Low, ERL) se define como la concentración más baja de un metal que produce efectos biológicos adversos en el 10% de los casos, y en rango medio de efectos (Effect Range-Median, ERM) se define como el nivel al cual el 50% de los estudios evaluados reportan la existencia de efectos biológicos.

Tabla IV.A.4. Criterios de calidad para la concentración de Zn, Cd, Pb y Cu en sedimentos

Metal	Valores medios en roca sedimentaria continental (esquistos) [Turekian y Wedepohl, 1961]	Niveles guía para la protección de la vida acuática [Canadian Sediment Quality Guidelines, 2002]		Niveles NS&T (NOAA) con efectos biológicos [Buchman, 2008]	
	Niveles de fondo	ISQG ⁽¹⁾	PEL ⁽²⁾	ERL ⁽³⁾	ERM ⁽⁴⁾
Zn	95	124	271	150	410
Cd	0,3	0,7	4,2	1,2	9,6
Pb	20	30,2	112	46,7	218
Cu	45	18,7	108	34	270

⁽¹⁾ ISQG: Valor guía de calidad del sedimento

⁽²⁾ PEL: Nivel con efectos probables sobre la vida acuática

⁽³⁾ ERL: Concentración con efectos biológicos bajos (efectos en menos del 10% de organismos)

⁽⁴⁾ ERM: Concentración con efectos biológicos considerables (efectos en más del 50% de organismos)

IV.A.4.3. Muestras biológicas

La fauna marina de los ecosistemas acuáticos puede dividirse en tres grandes grupos según la zona en la que habitan [Artolachipi y Calvo, 2006]: pelágicas (constituyen este grupo animales capaces de nadar activamente a una velocidad que les permite ir contra corriente, pudiendo efectuar desplazamientos verticales y horizontales e incluso realizar largas migraciones), nectobentónicas o demersales (son especies ligadas al fondo, ya sea porque encuentran sus posibles presas allí o bien porque encuentran en el bentos refugio ante posibles depredadores) y bentónicas (son aquellas especies fuertemente ligadas al fondo, en el que se pasan gran parte de su vida, siendo muy limitados los desplazamientos sobre él).

Los peces seleccionados en este estudio fueron especies fuertemente ligadas al fondo (bentónicas), como lenguados (*Solea senegalensis*) y especies cuyo hábitat se encuentra ligeramente ligado al fondo marino como sucede con las especies nectobentónicas o demersales, como rascacios (*Scorpaena porcus*), rubios (*Trigloporus lastoviza*) y sargos (*Diplodus sargas sargus*). El hecho de elegir especies ligadas al fondo marino fue determinante para la obtención de resultados asociados de forma más o menos relativa a cada punto de muestreo, lo cual sería muy difícil en el caso de elegir

especies pelágicas con total capacidad de migración. Un segundo motivo para esta elección fue la relativa abundancia de estas especies en la zona de muestreo.

A continuación se describen más detalladamente la morfología y características de estas cuatro especies:

➤ **Lenguado:** *Solea senegalensis* (Kaup, 1858)

El lenguado, *Solea senegalensis*, pertenece a la familia de los Soleidos, que comprende unos treinta géneros (todos ellos dextrógiros) de cuerpo plano, oval y alargado, con la cabeza redonda y poco saliente, caracterizados por poseer un hocico redondo y carnoso, con una pequeña boca arqueada y que se abre hacia abajo, sin dientes palatinos; la mandíbula superior está más desarrollada que la inferior. Los ojos son muy pequeños y próximos y se sitúan en el flanco derecho. Las escamas del tronco continúan por la cabeza. Perteneciente a la fauna bentónica, se caracteriza por tener el tubo nasal anterior del lado ciego alejado del borde cefálico; la aleta pectoral derecha redondeada y subsimétrica con una membrana interracial negra, el último radio de las aletas dorsal y anal está unido al pedúnculo caudal por una membrana y la aleta dorsal se inicia por delante del ojo dorsal. La coloración de fondo del lado ocular es variable, adaptándose miméticamente al entorno predominante en el sustrato: normalmente varía de un marrón verdoso oscuro a un marrón rojizo claro, casi anaranjado; presenta ocelos de color azul de tamaño variable, dispuestos en filas longitudinales, a veces no muy claros, que desaparecen rápidamente con la muerte del animal; manchas marrón oscuro dispuestas en la línea media del cuerpo, de tamaño mediano, y otras más pequeñas en filas transversales. Los ojos son de color verde metálico en vivo (Figura IV.A.3) [Arellano y Sarasquete, 2005].

El lenguado es un teleósteo con sexos separados, sin caracteres sexuales externos diferenciales, madurando por primera vez entre el tercer y cuarto año de vida (25-30 cm de longitud). Los lenguados cultivados miden alrededor de 14-18 cm y pesan unos 37-43 g, un año después de la eclosión. Son animales de hábitos básicamente nocturnos, predadores bentónicos (anélidos, moluscos), viven enterrados en la arena durante el día, y su ritmo de crecimiento es regular teniendo unos 300 g y 30 cm al tercer año, pudiendo alcanzar una talla máxima de 60 cm y 800 g de peso [Arellano y Sarasquete, 2005].

Frecuenta una amplia variedad de hábitats litorales, con preferencia por los fondos blandos de zonas de marismas, esteros y estuarios. En su amplia distribución geográfica, principalmente por las costas occidentales africanas -por algo su epíteto científico es *senegalensis*-, están incluidas las costas del golfo de Cádiz y del Mediterráneo occidental, pero es particularmente abundante en las costas de Cádiz y

Huelva. Se trata de una especie muy apreciada gastronómicamente y de alto valor comercial, que se cultiva a escala industrial en piscifactorías andaluzas [Junta de Andalucía, 2007].



Figura IV.A.3. *Solea Senegalensis* (Kaup, 1858)

➤ **Rascacio:** *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758)

El rascacio, *Scorpaena porcus*, es un pez de la familia de los Escorpénidos. Es un pez robusto, que varía desde los 15 cm hasta los 30 cm de talla máxima. Tiene la cabeza provista de espinas, con apéndices en forma de plumas sobre los ojos. Su color es pardo, con tonalidades pardas rojizas y manchas de color oscuro (Figura IV.A.4).

Son especies solitarias, sedentarias, con glándulas venenosas, indolentes y dotadas de poca movilidad. El rango de profundidad a la que vive va desde los 5 hasta los 800 m. Se halla frecuentemente en fondos rocosos y praderas de posidonia. Se alimenta de cangrejos [Aguilera-Colmenero, 2009].

Su distribución geográfica se limita a las costas marroquíes, el Mar Mediterráneo y desde las Islas Británicas a las Azores [Linnaeus, 1758; Valledor de Lozoya, 1994].



Figura IV.A.4. *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758)

➤ **Rubio:** *Trigloporus lastoviza*, (Bonnaterre, 1788)

El rubio, *Trigloporus lastoviza*, es un pez de la familia de los *Triglidae*. Es de cuerpo alargado, casi cilíndrico, con crestas dérmicas transversales. Cabeza cubierta de placas óseas, crestas y espinas. Perfil cefálico truncado. Rostro redondeado. Espina del opérculo corta. Dos aletas dorsales separadas. Aletas pectorales largas. Línea lateral con escamas pequeñas con una espina en el centro. Coloración rojo carmín, salpicada de manchitas negras por todo el cuerpo; aletas pectorales con la membrana azul violeta, con manchitas celestes. Puede medir hasta 30 cm de longitud [Junta de Andalucía, 2007] (Figura IV.A.5).

Viven sobre el fondo, entre los 50 y los 200 metros de profundidad, en fondos arenosos, limosos o fangosos. Durante los veranos se acercan a las costas.

Su área de distribución se centra en el Atlántico, costas africanas hasta Gran Bretaña y Mediterráneo [Boudaya, 2000].



Figura IV.A.5. *Trigloporus lastoviza* (Bonnaterre, 1788)

➤ **Sargo:** *Diplodus sargus sargus* (Linnaeus, 1758)

El sargo común, *Diplodus sargus sargus*, es un pez de la familia de los Espáridos, muy común en el Mar Mediterráneo. El nombre del género viene del griego diplos y odous, palabras que significa doble y diente, en alusión a que tienen dos tipos de dientes: incisivos y molares (Figura IV.A.6).

El sargo tiene el cuerpo comprimido lateralmente y ovalado. Su color es gris plata, con 7 u 8 franjas verticales oscuras, las cuales tienden a desaparecer en los adultos. Posee una mancha más gruesa y oscura en el pedúnculo caudal, la cual no desaparece. Por lo general, tiene un tamaño entre los 20 y 35 cm, aunque puede llegar a alcanzar

una longitud de hasta 50 cm. Su alimentación se basa en crustáceos, moluscos y equinodermos. Gracias a sus fuertes molares puede triturar las conchas de los moluscos [Riede, 2004; Aguilera-Colmenero, 2009].

Esta especie suele nadar en grupos reducidos y vive en fondos rocosos, siendo habitual encontrarla a una profundidad mayor de 25 m.

Es un pez óseo, comestible y apreciado. Se encuentra en todo el litoral andaluz [Junta de Andalucía, 2007].



Figura IV.A.6. *Diplodus sargus sargus* (Linnaeus, 1758)

Capítulo IV. B

Parte experimental

IV.B.1. Toma de muestra

A continuación se desarrolla el procedimiento que fue llevado a cabo para la obtención de las distintas muestras estudiadas de agua, sedimentos y peces en la Bahía de Algeciras.

IV.B.1.1. Muestras de agua

Las muestras de agua (así como las de sedimentos) fueron tomadas en los puntos de muestreo seleccionados desde una embarcación perteneciente a la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, llamada "Isla de Tarifa" (Figura IV.B.1).



Figura IV.B.1. Embarcación "Isla de Tarifa" de la Junta de Andalucía, empleada en las campañas de muestreo para agua y sedimento

Todo el procedimiento se realizó desde la proa de la embarcación, para evitar posibles contaminaciones procedentes de los motores ubicados en la popa. La toma de muestra de agua se llevó a cabo con ayuda de un tubo de teflón (6406-66 de Cole-Parmer Instrument Co. Illinois U.S.A.) acoplado a un automuestreador portátil o bomba peristáltica (MasterFlex E/S portable sampler nº 07571-05, Cole-Parmer Instrument Co. Illinois U.S.A., con cabezal MasterFlex 07518-02).

Esta operación de toma de muestra requirió la colaboración de tres personas. Así, una de ellas sostenía una pértiga telescópica de 4 metros de longitud, a la que estaba sujeto el tubo de teflón. Su cometido era el de situar el extremo del tubo a una altura adecuada para la captación de agua superficial, además de mantenerlo lo más lejos

posible de la embarcación para evitar cualquier posible contaminación que ésta pudiera suponer y no afectar la representatividad de las muestras de agua. Las otras dos personas restantes, fueron las encargadas de realizar la toma de muestra propiamente dicha, siguiendo el protocolo de limpieza denominado “manos limpias-manos sucias”. De esta forma, una sola persona (“manos limpias”) era la que estaba en contacto con los botes para la recogida de agua, utilizando doble capa de guantes de plástico. La otra persona (“manos sucias”) debía sostener el extremo del tubo de salida del agua y estaba en contacto con el resto de material que iba siendo requerido; igualmente se encargaba del encendido y apagado de la bomba peristáltica empleada como sistema de aspiración. En la Figura IV.B.2 se visualizan parte de los materiales que fueron empleados en la toma de muestras de agua.

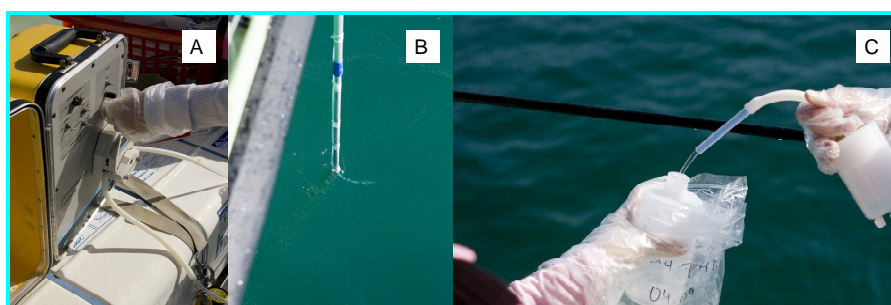


Figura IV.B.2. Materiales e instrumentos empleados en la toma de muestras de agua:
A) Bomba peristáltica; B) Pértiga con tubo de teflón; C) Botes de polietileno y tubos sujetos por “manos limpias-manos sucias”

En cada punto de muestreo, se inició el proceso mediante un enjuague global del sistema de bombeo, con la propia agua de la zona, durante unos minutos. Del mismo modo, fueron enjuagados los propios botes previamente a la toma de la muestra definitiva. Determinadas muestras, que así lo precisaban, fueron filtradas *in situ* mediante acoplamiento en línea del tubo de teflón con un sistema de filtración con filtros de membrana de 0,45 micras de tamaño de poro (Whatman groundwater filter capsule, 0,45 μm 29705-92, Cole-Parmer Instrument Co. Illinois U.S.A.), todo ello conectado a la bomba peristáltica. El agua fue recolectada en los botes destinados a tal fin, previamente lavados minuciosamente. El protocolo de limpieza del material empleado en el muestreo se encuentra en el Anexo A.1. Los botes empleados eran de polietileno de baja densidad y fueron perfectamente etiquetados, cerrados y aislados en dos bolsas de plástico con cierre hermético. Tras la toma de muestra los botes se conservaron y transportaron en neveras de plástico refrigeradas con bloques de hielo hasta su llegada al laboratorio, donde las muestras fueron inmediatamente tratadas.

Como consecuencia de los estudios de especiación a realizar en este estudio, en cada punto de muestreo se requirió la toma de las siguientes muestras:

- 500 mL de agua sin filtrar. Tras la llegada al laboratorio se adicionó a este volumen 1 mL de ácido nítrico Suprapur (HNO_3), de modo que la concentración ácida final fuera de 2 mL L^{-1} . La muestra permaneció durante dos semanas a temperatura ambiente, para que el ácido pudiera lixiviar los metales que pudieran haberse adsorbido en las paredes del recipiente durante el transporte. Transcurrido este tiempo, se introdujo en el congelador a una temperatura de -20°C .
- 500 mL de agua de mar filtrada *in situ*. Tras la llegada al laboratorio se adicionó, a este volumen 1 mL de HNO_3 Suprapur, de modo que la concentración ácida fuera de 2 mL L^{-1} . La muestra permaneció durante dos semanas a temperatura ambiente, por la misma razón que en el caso anterior. Transcurrido este tiempo, se introdujo en el congelador a una temperatura de -20°C .
- 500 mL de agua filtrada *in situ*, a la que no se adicionó ningún reactivo y fue introducida en el congelador a -20°C inmediatamente después de la llegada al laboratorio.
- 500 mL de agua filtrada *in situ*, a la que se añadió en el laboratorio un volumen de 10 mL de disolución reguladora ácido acético/acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$) de pH 4,7 y concentración 3 mol L^{-1} . Posteriormente, se introdujo en el congelador a una temperatura de -20°C .
- 500 mL de agua filtrada *in situ*, a la que se añadió 1 mL de ácido clorhídrico Suprapur (HCl) a la llegada al laboratorio y fue congelada hasta su análisis.
- 500 mL de agua sin filtrar, que fueron utilizados para el cálculo de la densidad del agua mediante pesada, así como para evaluar la materia suspendida presente en las muestras de agua.

IV.B.1.2. Muestras de sedimento

Las muestras de sedimento fueron tomadas desde la misma embarcación utilizada en el caso de las muestras de agua. Para ello, se empleó una draga tipo "Eckman-Birge" y el sedimento extraído se depositó dentro de dos bolsas de plástico con cierre hermético, perfectamente etiquetadas para cada muestra. Las muestras de sedimento se introdujeron en neveras de plástico refrigeradas con bloques de hielo hasta su

llegada al laboratorio, donde se pasaron a un congelador a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su estudio. Tanto el pretratamiento como el análisis de las muestras dependieron del protocolo seguido para el análisis del contenido total y especiación, que aparece detallado en apartados posteriores. En la Figura IV.B.3 se muestran imágenes de la toma de muestra de sedimento.

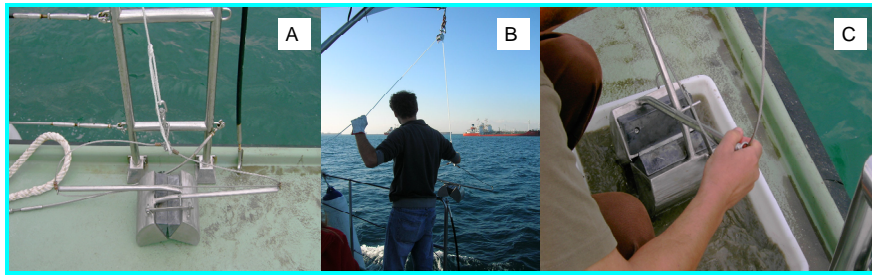


Figura IV.B.3. Toma de sedimentos del fondo marino y material empleado:
A) Draga tipo "Eckman-Birge"; B) introducción de la draga en el medio; C) obtención del sedimento

IV.B.1.3. Muestras biológicas: peces

Los peces fueron capturados mediante trasmallo desde un barco de pesca contratado para la captura de estas especies (Figura IV.B.4). Los peces se diseccionaron inmediatamente después de su captura, para así extraer los distintos órganos objeto de estudio: branquias, hígado y músculo. Las muestras de tejidos obtenidas se conservaron en el interior de un tanque con nitrógeno líquido hasta su llegada al laboratorio, donde se almacenaron a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.



Figura IV.B.4. Toma de muestra de peces: A) embarcación empleada; B) extracción de los peces mediante trasmallo; C) medida de las especies

IV.B.2. Metodología

Para llevar a cabo este estudio sobre la contaminación por metales pesados en la Bahía de Algeciras se seleccionaron los puntos más representativos de la zona. De esta manera, se establecieron 5 puntos donde se realizaron estudios exhaustivos en muestras de agua, sedimentos y peces a lo largo de cuatro muestreos consecutivos (11/2007, 04/2008, 10/2008 y 04/2009). Los análisis realizados consistieron en la determinación del contenido metálico total de Zn, Cd, Pb y Cu, así como su especiación y la posterior correlación de los resultados obtenidos en los distintos compartimentos medioambientales analizados.

A continuación se detalla la metodología empleada para la caracterización básica de las muestras, la determinación del contenido metálico y su especiación en muestras de agua, sedimentos y peces tomadas en la bahía. En los Anexos 2 y 3 se describen los equipos empleados, así como los reactivos y disoluciones empleadas a lo largo de este procedimiento.

IV.B.2.1. Parámetros físico-químicos en aguas

Algunos parámetros generales de interés en las muestras de agua fueron caracterizados *in situ* en la propia embarcación. Para ello, se empleó una sonda multiparamétrica portátil previamente calibrada, con el fin de registrar los valores de pH, temperatura, salinidad, conductividad, sólidos disueltos totales y oxígeno disuelto en cada punto de muestreo.

Además, se evaluaron otros parámetros en el laboratorio:

➤ Densidad del agua

El cálculo de la densidad del agua se realizó por pesada y por cuadruplicado. Para ello, se emplearon matraces aforados de 10 mL de capacidad, previamente secados y tarados. Mediante diferencia de pesos, se calculó la masa de agua que contenía el matraz. Esta cantidad dividida entre el volumen proporcionó el dato de densidad del agua de mar en cada punto de muestreo.

➤ Materia suspendida en el agua

Para evaluar la materia suspendida contenida en el agua, se filtraron cantidades de agua conocidas (200-250 g) con ayuda de una bomba de vacío, empleando filtros de nylon con un tamaño de poro de 0,45 μm , previamente lavados, secados y tarados. Posteriormente, se secaron en una estufa a 105 °C hasta alcanzar éstos un peso constante. El contenido de materia suspendida (g L^{-1}) se obtuvo por diferencia entre el peso seco del filtro de nylon antes y después de filtrar el agua, referido al volumen de agua filtrado (calculado mediante el dato de densidad previamente determinado).

➤ Materia orgánica en la materia suspendida

Para obtener el porcentaje de materia orgánica en la materia suspendida se utilizaron los mismos filtros de nylon empleados previamente para la determinación de la materia suspendida en el agua. Estos filtros, secos y pesados, que retuvieron una cantidad conocida de materia en suspensión fueron calcinados a una temperatura de 550 °C durante 3 horas. El calcinado se llevó a cabo en un horno de mufla con programa para el control de la temperatura. Los crisoles usados en la calcinación fueron previamente lavados, secados y tarados. Tras la calcinación, se calculó el porcentaje de materia orgánica en la materia en suspensión a partir de la pérdida de peso observada tras el proceso.

➤ Carbono orgánico disuelto (COD)

Estas medidas acerca del carbono orgánico disuelto en las aguas, se realizaron a partir de las muestras de agua filtradas y acidificadas con HCl Suprapur hasta una concentración de 2 mL L^{-1} . Para la determinación se hizo uso de un equipo analizador de carbono, cuyas medidas se basan en el método diferencial en el que el contenido del COD es calculado por diferencia entre el contenido de carbono total y el contenido de carbono inorgánico en la muestra.

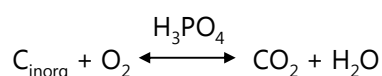
Análisis del contenido de carbono total disuelto

- Se colocó la muestra en el automuestreador, desde donde se tomaron e inyectaron 500 μL de muestra en el interior de un horno vertical de cuarzo.
- Tanto el carbono orgánico como inorgánico presente en la muestra fue transformado en CO_2 y vapor de agua, proceso catalizado por la presencia de platino que tuvo lugar en el horno a una temperatura de 800 °C.

- El CO₂ generado fue transportado a través de un flujo continuo de gas O₂ hasta un detector de infrarrojo, donde se determinó la concentración de carbono total a partir de un calibrado realizado con una mezcla de carbonato/bicarbonato.

Análisis del contenido de carbono inorgánico disuelto

- Otra alícuota de 500 µL de muestra de agua fue inyectada en una cámara de acidificación que contenía ácido ortofosfórico para análisis (H₃PO₄), al 10%, con control de temperatura a 10 °C, en la que burbujeaba continuamente gas O₂.
- El carbono inorgánico presente en la muestra sufrió la siguiente reacción en la cámara de acidificación:



- El CO₂ producido en el paso anterior se determinó mediante el mismo detector infrarrojo que el empleado en el caso del carbono total.

➤ Materia orgánica en los sedimentos

Para el análisis de la materia orgánica contenida en los sedimentos, se tomó la fracción de éstos de tamaño inferior a 2 mm (eliminando los gruesos). Se expresó como porcentaje de sólidos volátiles (SV) y fue determinada como pérdida de peso tras 30 minutos de combustión en horno mufla a una temperatura de 550 °C.

IV.B.2.2. Contenido total y especiación de Zn, Cd, Pb y Cu en agua de mar

Como ya se expuso en la introducción general, los metales pueden encontrarse en el agua en distintas formas y/o asociados a diferentes compuestos. Para poder determinar y analizar cada fracción, el esquema más frecuentemente utilizado se basa en el análisis de las muestras tras cambios de pH. Debido a su simplicidad, ha sido ampliamente utilizado para explicar la especiación en el seno de muestras acuosas [Duinker y Kramer, 1977; Hasle y Abdullah, 1981; Fischer y col. 1984; Batley 1987; Vicente-Martorell y col., 2009].

Este esquema separa las especies en distintas fracciones, lábiles, poco lábiles y no lábiles, diferenciando entre las asociadas a la materia orgánica y las asociadas a la materia inorgánica. A continuación, se detallan los pretratamientos requeridos para los

distintos análisis en las muestras de agua, finalmente analizadas mediante la técnica de voltamperometría de redisolución anódica de pulso diferencial (Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry, DPASV). En la Figura IV.B.5 aparece el esquema de especiación aplicado.

Las muestras se trasladaron del congelador al frigorífico, para su progresiva descongelación, la noche antes de ser analizadas.

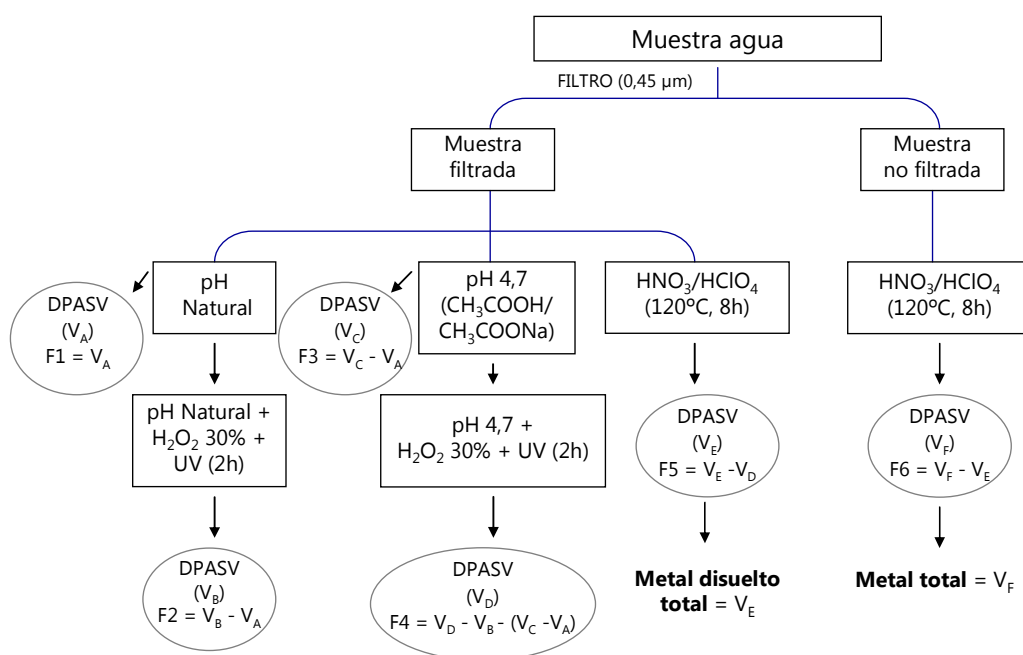


Figura IV.B.5. Esquema de especiación para los metales Zn, Cd, Pb y Cu en muestras de agua de mar [Granado-Castro, 2005; Vicente-Martorell y col., 2009]

El significado físico de los distintos términos y fórmulas empleados, así como el procedimiento a seguir en la aplicación de este esquema de especiación es el siguiente:

➤ V_A – Concentración de metal en la muestra de agua filtrada a pH natural

Se analiza la muestra filtrada a pH natural (sin adición de ningún reactivo) mediante la técnica DPASV directamente y en el menor tiempo posible, evitando así posibles equilibrios de adsorción/desorción y precipitación/disolución de los metales presentes en el agua.

F1 (Fracción o Fase 1) representa la fracción de los *metales lábiles disueltos inorgánicos*. Se obtiene a partir del valor de concentración V_A .

$$F1 = V_A$$

➤ V_B – Concentración de metal en la muestra de agua filtrada a pH natural sometida a digestión UV (con H_2O_2)

Para la obtención de este valor, alícuotas de 10 mL de muestra de agua filtrada a pH natural (misma muestra anterior) se someten a digestión mediante la adición de 50 μ L de peróxido de hidrógeno Suprapur (H_2O_2) al 30%, y son irradiadas durante dos horas empleando un digestor UV. Finalmente, las muestras se miden por DPASV.

F2 (Fracción o Fase 2) representa la fracción de los *metales lábiles disueltos orgánicos* en la muestra de agua. Se calcula como la diferencia entre el valor V_B y V_A , donde V_B representa la concentración total de los metales disueltos considerados como lábiles.

$$F2 = V_B - V_A$$

➤ V_C – Concentración de metal en la muestra de agua filtrada a pH 4,7

Según este esquema de especiación, la muestra de agua filtrada *in situ* a la que se le adicionó disolución reguladora ácido acético/acetato de sodio (CH_3COOH/CH_3COONa , 3 mol L^{-1}) de pH 4,7 se mide por DPASV con la mayor rapidez posible tras su descongelación, obteniéndose un valor numérico expresado como V_C .

F3 (Fracción o Fase 3) representa la fracción de los *metales poco lábiles disueltos inorgánicos*. Se calcula como la diferencia entre los valores de concentración V_C y V_A .

$$F3 = V_C - V_A$$

- V_D – Concentración de metal en la muestra de agua filtrada ajustada a pH 4,7 y sometida a digestión UV (con H_2O_2)

Se toman alícuotas (10 mL) de la muestra de agua filtrada y acondicionada a pH 4,7 a las cuales se adicionan 50 μ L de H_2O_2 Suprapur al 30%. Después se someten a un proceso de digestión mediante radiación UV durante 2 horas y se miden por DPASV.

F4 (Fracción o Fase 4) representa la fracción de los *metales poco lábiles disueltos orgánicos*, que se obtiene a partir de la expresión:

$$F4 = V_D - V_B - (V_C - V_A);$$

correspondiéndose la expresión $V_D - V_B$ con el *contenido total de los metales poco lábiles disueltos* en la muestra de agua.

Este estudio de especiación se comenzó por el análisis de las muestras no filtradas y filtradas a pH 2 mediante DPASV, que como se ha mencionado corresponden a las concentraciones metálicas total y disuelta, respectivamente. Como se verá en los resultados, las concentraciones de metal disuelto fueron muy bajas, por lo que no se pudo continuar con las determinaciones de las fracciones lábil, poco lábil y no lábil (inorgánicas y orgánicas) descritas previamente, al no alcanzar los límites de detección de la técnica empleada en la mayoría de los casos.

Con las cantidades de metal presentes en las muestras de agua sí pudieron realizarse los análisis del contenido metálico total y disuelto para Zn, Cd, Pb y Cu que se describen a continuación.

- V_E – Concentración de metal en la muestra de agua filtrada a pH 2

En este caso se empleó el agua filtrada y acidificada con ácido nítrico, que una vez descongelada fue sometida al siguiente pretratamiento:

- Se tomaron 45 mL de agua y se depositaron en un reactor de teflón de PTFE (politetrafluoroetileno) de 100 mL de capacidad (BRAND, 1305 38, Wertheim (Alemania)).
- A estos 45 mL de muestra de agua se les adicionaron 0,2 mL de ácido nítrico Suprapur (HNO_3), junto con 0,125 mL de ácido perclórico Suprapur ($HClO_4$).
- Tras comprobar el correcto cierre del reactor, se introdujo en estufa a una temperatura de 120 °C durante 8 horas.

- Finalizado este proceso y una vez enfriado el reactor, la muestra digerida se enrasó con agua desionizada (Milli-Q), utilizando para ello un matraz aforado de 50 mL de capacidad.
- Finalmente, las muestras se conservaron en recipientes de poliestireno a una temperatura de 4 °C (en frigorífico) hasta el momento de su análisis.

Posteriormente, la medida de la muestra de agua digerida se realizó mediante la técnica de voltamperometría de redisolución anódica de impulso diferencial (DPASV) a pH 2. Para ello, se tomaron alícuotas de 5 mL de agua y se ajustaron las muestras hasta pH 2, mediante una disolución de amoníaco Suprapur (NH₃) de concentración 0,5 mol L⁻¹, enrasando posteriormente hasta 10 mL con agua Milli-Q. La dilución final de la muestra fue de 1:2.

Tras la aplicación de este procedimiento, fue posible conocer el *contenido metálico total disuelto* en la muestra de agua, entendiendo por contenido total la suma de las fracciones lábil, poco lábil y no lábil. Este dato se representa como V_E.

En el supuesto de conocer también V_D (dato que refleja el contenido metálico total lábil y poco lábil en la muestra), se puede obtener F5 (Fracción o Fase 5), la cual representa la fracción de los *metales no lábiles disueltos totales*, calculada como diferencia entre V_E y V_D:

$$F5 = V_E - V_D$$

➤ V_F – Concentración de metal en la muestra de agua no filtrada a pH 2

Se realizó el mismo ataque ácido descrito anteriormente, con la única variación de que la muestra de agua era la no filtrada y acidificada con ácido nítrico. Asimismo, se siguió el mismo procedimiento para analizar la muestra por DPASV.

El dato que se obtiene de forma directa tras la medida por DPASV (denominado V_F) se corresponde con el *contenido metálico total*.

Empleando el dato anterior correspondiente al contenido metálico total disuelto (V_E) es posible calcular F6 (Fracción o Fase 6), mediante la fórmula siguiente que representa el *contenido metálico total presente en la materia suspendida*.

$$F6 = V_F - V_E$$

Todas las medidas electroquímicas mediante DPASV se realizaron bajo las condiciones y parámetros descritos en la Tabla IV.B.1.

Tabla IV.B.1. Parámetros electroquímicos establecidos para el análisis de Zn, Cd, Pb y Cu mediante la técnica DPASV (*Application Bulletin No. 231/2 e, Metrohm*)

Parámetros electroquímicos establecidos para la medida de Zn(II), Cd(II), Pb(II) y Cu(II) por DPASV	
Electrodo de trabajo	HMDE
Tamaño de gota de mercurio	6
Potencial de deposición (E_d)	-1,15 V
Tiempo de deposición (t_d)	300 s
Amplitud de pulso (U_{ampl})	0,05 V
Salto de potencial (U_{step})	0,006 V
Intervalo de tiempo para el salto de potencial (t_{step})	0,1 s
Velocidad de barrido	0,06 V/s
Potencial inicial de barrido	-1,15 V
Potencial final de barrido	0,20 V
Pico de potencial para la medida de Zn(II)	-0,98 V
Pico de potencial para la medida de Cd(II)	-0,56 V
Pico de potencial para la medida de Pb(II)	-0,38 V
Pico de potencial para la medida de Cu(II)	-0,10 V

IV.B.2.2.1. Análisis de blancos, límites de detección y validación de la técnica DPASV para la determinación de trazas de Zn, Cd, Pb y Cu en aguas

Previamente a la determinación del contenido metálico total y el contenido metálico disuelto en las muestras de agua tomadas de la bahía, se llevaron a cabo los análisis de los blancos, los cálculos de los límites de detección y la validación de la técnica de DPASV, para cada uno de los metales estudiados.

La preparación de los blancos así como la manipulación de todas las muestras de agua se realizaron en todo momento en el interior de una campana de flujo laminar Clase 100 con atmósfera limpia, para evitar los posibles riesgos de contaminación.

➤ Análisis de los blancos y determinación de los límites de detección

Con el propósito de evaluar el contenido metálico procedente del pretratamiento de las muestras y de la propia metodología de análisis, se realizaron y determinaron distintos blancos. Como en cualquier método, los blancos correspondientes son sometidos exactamente al mismo procedimiento que las muestras. En este caso, la muestra de agua fue sustituida por agua desionizada Milli-Q, donde un volumen de 250 mL fue filtrado empleando el mismo sistema de filtración que en la fase de muestreo (filtros de membrana de 0,45 micras de tamaño de poro), para ser utilizado en la preparación de los blancos del contenido disuelto. Por otro lado, se empleó agua Milli-Q sin filtrar para los blancos correspondientes al contenido metálico total. Dado que el protocolo de pretratamiento a seguir para la determinación de ambos contenidos metálicos (total y disuelto) en las muestras de agua era idéntico, se añadieron los mismos reactivos y se sometieron los blancos a la digestión descrita en el apartado previo, en estufa a 120 °C durante 8 horas. Las condiciones electroquímicas empleadas en la determinación por DPASV fueron las registradas en la anterior Tabla IV.B.1. En la Tabla IV.B.2 se recogen las concentraciones obtenidas para cada metal en los distintos blancos analizados (contenido metálico total y contenido metálico total disuelto).

Tabla IV.B.2. Concentraciones de Zn, Cd, Pb y Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$) en los blancos realizados para los análisis del contenido metálico total y del contenido metálico disuelto ($n=3$)

Muestra Blanco	Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Contenido metálico total	0,832 \pm 0,131	<L.D.	0,162 \pm 0,014	<L.D.
Contenido total disuelto	<L.D.	<L.D.	0,157 \pm 0,011	<L.D.

<L.D.: por debajo del límite de detección

Además, se evaluaron los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) de la técnica DPASV para el análisis de estos metales, los cuales pueden calcularse mediante las expresiones siguientes:

$$LD = 3\sigma_b / b$$

$$LQ = 10\sigma_b / b ;$$

donde b es la pendiente de la recta de calibración y σ_b es la desviación estándar de la señal analítica del blanco. Los límites de detección y cuantificación para los metales estudiados se muestran en la Tabla IV.B.3.

Tabla IV.B.3. Límites de detección para el análisis de Zn, Cd, Pb y Cu mediante DPASV ($\mu\text{g L}^{-1}$) en muestras de agua ($n=10$)

Metal	Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Límite detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,660	0,013	0,042	0,247

➤ Validación de la técnica DPASV mediante una muestra de referencia

Previamente a la determinación de las muestras de agua tomadas de la bahía, se realizó la validación de la técnica de análisis DPASV empleada en este capítulo de la Tesis. Para ello, se empleó la muestra de referencia certificada *BCR-CRM 505* (muestra de agua de estuario, acidificada a pH 1,6) de la *Community Bureau of Reference* (BCR). Junto con la muestra comercial, se adjuntan los valores certificados para los metales Zn, Cd y Cu; no siendo así en el caso del Pb, para el que se proporciona un valor de concentración indicativo.

El análisis se realizó por duplicado siguiendo el siguiente procedimiento:

- Se tomaron dos alícuotas (10 mL) de la muestra de referencia certificada de agua de estuario (*BCR-CRM 505*) y se depositaron en sendos tubos de cuarzo.
- Se añadieron a cada tubo 50 μL de H_2O_2 al 30%.
- Las muestras se sometieron a digestión mediante radiación ultravioleta (UV) durante un periodo de 2 horas. Durante todo el proceso se controló que la temperatura no fuera superior a 78 °C, para que no alcanzara la ebullición y evitar pérdida de muestra.
- Una vez enfriadas las muestras a temperatura ambiente, se conservaron y almacenaron en recipientes de poliestireno.
- Mediante pesada, se depositaron 10 mL de muestra en la celda de medida, empleando el valor de la densidad de la muestra para la transformación del peso en volumen.

- Previamente a la medida por DPASV, se ajustó el pH de la muestra hasta un valor de 2-2,4, empleándose para ello el volumen necesario de una disolución diluida de NH_3 Suprapur.
- A continuación, se midió la muestra por DPASV.

En la Tabla IV.B.4 se presentan los resultados experimentales obtenidos por DPASV para cada metal tras analizar la muestra de referencia certificada *BCR-CRM 505*. Estos valores fueron comparados con sus valores certificados (para Zn, Cd y Cu) y en el caso del Pb con su valor indicativo.

Los porcentajes de recuperación para los metales Zn, Cd y Cu resultaron mayores al 88% en todos los casos, por lo que la validación se consideró satisfactoria. El empleo de la técnica voltamperométrica DPASV resultó bastante adecuado para el análisis y determinación de estos analitos. Por otro lado, en el caso del Pb se encontró una recuperación aceptable, por encontrarse el valor detectado dentro del intervalo dado como valor indicativo por la BCR.

Tabla IV.B.4. Validación de la técnica DPASV utilizada en el análisis de trazas de Zn, Cd, Pb y Cu empleando la muestra de referencia certificada *BCR-CRM 505* (agua de estuario) ($n=2$)

Metal	Valor observado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor certificado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación (%)
Zn	$10,39 \pm 1,07$	$11,24 \pm 0,72$	92,4
Cd	$0,08 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	88,9
Cu	$2,00 \pm 0,13$	$1,87 \pm 0,10$	107,0
Pb	$0,09 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,03$ *	

* Valor indicativo.

IV.B.2.3. Contenido total y especiación de Zn, Cd, Pb y Cu en sedimentos

A partir de las muestras de sedimento extraídas de la Bahía de Algeciras, se analizaron las concentraciones totales de Zn, Cd, Pb y Cu y se estudiaron los niveles metálicos existentes en las distintas fases definidas por el método de especiación conocido como "extracción secuencial BCR". Para ambos estudios, se partió de la fracción fina del sedimento por ser la más adecuada para realizar este tipo de análisis. El pretratamiento al que fueron sometidas las distintas muestras de sedimento se detalla a continuación:

- Días antes de su análisis, la muestra se sacó del congelador y se dejó en el frigorífico hasta su completa descongelación. Para acelerar este proceso se optó por disgregar el bloque de muestra congelada antes de introducirlo en el frigorífico.
- El sedimento descongelado se depositó sobre vidrios de reloj, los cuales se dejaron en estufa a una temperatura de 40 °C hasta alcanzar un grado de sequedad total.
- Una vez seco, se eliminaron las partículas más gruesas del sedimento mediante un tamizado previo empleando un tamiz de acero inoxidable de 2 mm de paso de luz de malla.
- De la fracción obtenida se tomaron pequeñas cantidades y se molturaron en un mortero de ágata hasta conseguir un polvo muy fino.
- Este polvo fino se hizo pasar a través de un tamiz de nylon de 63 µm de paso de luz de malla obteniéndose así la fracción fina, la cual se almacenó en botes de polietileno, de 50 mL de capacidad, en un lugar fresco y seco hasta el momento de su tratamiento y análisis.

A continuación, se describe la metodología seguida para el estudio del contenido metálico total y, posteriormente, la utilizada para la especiación de las muestras de sedimento.

IV.B.2.3.1. Estudio del contenido metálico total en sedimentos

El procedimiento llevado a cabo para poder evaluar el contenido metálico total de Zn, Cd, Pb y Cu en sedimentos se basó fundamentalmente en un proceso de digestión ácida mediante radiación infrarroja. Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- Para cada muestra de sedimento, se pesaron en una placa de teflón en torno a 0,2 g (anotándose el peso exacto) de la fracción fina (<63 µm) del sedimento.
- Se adicionaron a las placas 5 mL de ácido fluorhídrico (HF) de calidad para análisis, al 48%, para digerir el sedimento, y se irradió con lámparas de radiación infrarroja hasta llegar a sequedad. Se volvió a repetir este paso por segunda vez.
- Tras el doble ataque con HF, se adicionaron sobre el sedimento 5 mL de HNO₃ de calidad para análisis, al 65%, y se volvió a irradiar con las lámparas de radiación infrarroja hasta que el contenido de la placa se evaporó por completo. Posteriormente, se repitió de nuevo el ataque con ácido nítrico.
- El residuo seco digerido se extrajo con 20 mL de HCl (para análisis) 3,86 mol L⁻¹, mediante agitación magnética y calor (85±5 °C) durante 1 hora.
- Esta disolución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró a gravedad, empleando papel de filtro tipo Albet 1238.

- La disolución filtrada y las aguas de lavado del filtro fueron enrasadas hasta 50 mL en un matraz de vidrio.
- Por último, se trasvasó la disolución a un recipiente de polietileno y se almacenó en el frigorífico a 4 °C hasta ser analizada.

El análisis del contenido metálico total en estas muestras, pretratadas según lo descrito, se realizó mediante espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS).

IV.B.2.3.1.1. Análisis de blancos, límites de detección y validación de la metodología empleada para los análisis del contenido metálico total en sedimentos

➤ Análisis de los blancos y determinación de los límites de detección

Previo al análisis de las muestras, se estudiaron varios blancos para evaluar el contenido metálico asociado a la metodología de análisis empleada y se calcularon los límites de detección para cada metal. Se prepararon y analizaron un total de 4 blancos, según el mismo procedimiento de digestión empleado para la determinación del contenido metálico total en muestras de sedimento (apartado IV.B.2.3.1). Estos análisis fueron realizados mediante la técnica multielemental ICP-MS. En la Tabla IV.B.5 se muestran, para cada metal, las concentraciones halladas en los blancos y los límites de detección calculados para esta técnica de análisis. Para el caso del cadmio, el contenido metálico detectado en los blancos fue inferior al límite de detección de la técnica.

Tabla IV.B.5. Límites de detección de Zn, Cd, Pb y Cu en el análisis del contenido metálico total en sedimentos y concentración de los blancos por ICP-MS ($n_{L.D.}=10$, $n_{blancos}=4$)

Metal	Límite de detección (L.D.) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración media de los blancos \pm S.D. ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Zn	0,728	$7,50 \pm 1,48$
Cd	0,030	< L.D.
Pb	0,097	$2,85 \pm 0,61$
Cu	0,282	$1,84 \pm 0,27$

➤ Validación del método mediante una muestra de referencia

La validación del método de análisis del contenido metálico total de Zn, Cd, Pb y Cu en sedimentos se realizó empleando la muestra de referencia certificada de sedimento de estuario *SRM 1646a* del *National Institute of Standards and Technology (NIST)*. Para ello, se realizó la digestión total de una muestra de este sedimento por duplicado siguiendo el método anteriormente descrito. En la Tabla IV.B.6 se observan los porcentajes de recuperación obtenidos, los cuales resultaron ser muy adecuados (>83%).

Tabla IV.B.6. Validación del método de análisis del contenido metálico total en sedimentos empleando la muestra de referencia certificada de sedimento de estuario *SRM 1646a* ($n=2$)

Metal	Valor observado (mg kg ⁻¹)	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Recuperación (%)
Zn	40,68 ± 0,42	48,9 ± 1,6	83,2
Cd	0,150 ± 0,006	0,148 ± 0,007	101,4
Pb	10,92 ± 0,29	11,7 ± 1,2	93,2
Cu	8,54 ± 0,28	10,01 ± 0,34	85,3

IV.B.2.3.2. Estudio de especiación metálica en sedimentos

La especiación tiene como objetivo evaluar las diferentes formas químicas en las que se encuentran los metales que forman parte del sedimento. Supone un estudio de gran importancia, ya que la removilización o biodisponibilidad de un determinado metal, para unas condiciones ambientales dadas, va a depender de su forma química en el sedimento.

Como se ha mencionado previamente, para este estudio, se seleccionó el procedimiento de especiación propuesto por el BCR (Programa de Medición y Ensayo de la Comisión de la Comunidad Europea), en el que se obtienen tres fases o fracciones del sedimento (Fase I, II y III) y se trata el residuo final mediante digestión ácida [Davidson y col., 1999; Quevauviller y col., 1997]. Tras cada fase se van liberando secuencialmente los metales en sus formas químicas correspondientes, desde las especies más fácilmente disponibles o lábiles hasta la fracción metálica menos lábil. A continuación se describe en detalle los pasos seguidos en cada fase, indicando también las especies o formas químicas extraídas en cada una de ellas.

- Fase I o Fase Intercambiable. En esta fase se obtienen los metales solubles en agua o ácidos débiles, así como los intercambiables o asociados a carbonatos. Éstos pueden pasar fácilmente a la columna de agua en determinadas condiciones, tales como una disminución del valor de pH. Por tanto, esta es la fracción que contiene los metales más lábiles y que son más biodisponibles desde un punto de vista medioambiental. El procedimiento se detalla a continuación:

- Se pesó 1 g (anotándose el peso exacto) de la fracción fina del sedimento en un tubo de centrífuga.
- Se añadieron 40 mL de CH_3COOH (calidad para análisis) $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ sobre el sedimento y se sometió a agitación mecánica durante un total de 16 horas, a 150 traslaciones por minuto, sin demorar demasiado la agitación después de añadir el ácido.
- Tras este tiempo se colocaron los tubos en una centrífuga durante 30 minutos, a 4.000 rpm y 4°C , separando el líquido sobrenadante con ayuda de una pipeta.
- Esta disolución fue conservada en botes de polietileno a 4°C hasta el momento de su análisis.
- Por otro lado, se lavó el residuo con 20 mL de agua desionizada (Milli-Q), agitando mecánicamente durante 15 minutos y centrifugando posteriormente durante 30 minutos (a 4.000 rpm y 4°C).
- Se rechazó el sobrenadante y se conservó el residuo para la fase siguiente.

- Fase II o Fase Reducible. Las especies obtenidas tras esta extracción son aquellas formas químicas metálicas fácilmente reducibles, fundamentalmente las asociadas a óxidos de hierro y manganeso. Estos óxidos presentan una alta capacidad de adsorción pero son inestables en condiciones anóxicas. Esta situación podría darse en el medio marino, por ejemplo por la acción de determinados microorganismos. De esta forma los metales en el sedimento podrían pasar a formar parte de la columna de agua. El procedimiento consistió en:

- Sobre el residuo procedente de la fase anterior (en el tubo de centrífuga) se añadieron 40 mL de cloruro de hidroxilamonio para análisis ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, estabilizado a pH 1,5 con HNO_3 Suprapur. Esta disolución fue preparada los días próximos a la realización de la extracción, para asegurar así su eficacia.
- El tubo de centrífuga, bien cerrado, se introdujo en un baño de ultrasonidos para romper el residuo por vibración y, posteriormente, se agitó mecánicamente durante 16 horas para favorecer así su lixiviación. La

velocidad de la agitación fue de 150 traslaciones por minuto y se realizó inmediatamente después de añadir el extractante, sin demorar el proceso.

- Posteriormente, se centrifugó la solución durante 30 minutos (a 4.000 rpm y 4 °C), separando el líquido sobrenadante del residuo mediante una pipeta.
 - La fase líquida se vertió en recipientes de polietileno, los cuales se conservaron en frigorífico (a 4 °C) hasta el momento de su análisis.
 - Por otro lado, el residuo fue lavado con 20 mL de agua Milli-Q, agitando mecánicamente durante 15 minutos y centrifugando durante 30 minutos (a 4.000 rpm y 4 °C).
 - Finalmente, se rechazó el agua de lavado (mediante pipeta) y se aisló el residuo para proseguir con la siguiente fase.
- Fase III o Fase Oxidable. Esta fase contiene aquellas formas químicas de los metales que se encuentran asociados a la materia orgánica y sulfhídrica, los cuales son fácilmente oxidables. Dichos metales pueden pasar al agua bajo condiciones oxidantes. Éstas suelen darse cuando el sedimento sufre operaciones de dragado, mareas, corrientes o inundaciones, y estos se resuspenden entrando en contacto con el oxígeno del agua. El procedimiento fue el siguiente:
- Al residuo procedente de la Fase II se le adicionó, lenta y cuidadosamente, un volumen de 10 mL de H₂O₂ Suprapur 8,8 mol L⁻¹ (al 30%).
 - Mediante el empleo del baño de ultrasonidos se rompió el residuo por vibración para, a continuación, dejar los botes 1 hora a temperatura ambiente, agitándolos manualmente de forma ocasional.
 - Tras este tiempo se continuó con la digestión introduciendo los recipientes durante otra hora más en un baño de agua de 20 L a 85±2 °C. Durante la primera media hora las tapas de los botes estuvieron desenroscadas pero superpuestas, agitando los recipientes manualmente de forma ocasional. En cambio, permanecieron sin cubrir durante la última media hora hasta que el volumen se redujo a unos 3 mL.
 - Se repitió la adición de 10 mL de H₂O₂ 8,8 mol L⁻¹ sobre el sedimento digerido parcialmente, dejándose a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación ocasional. Durante otra hora, permaneció en el baño de agua a 85 °C hasta evaporarse y quedar 1 mL, sin llegar a sequedad total.
 - Se adicionaron 50 mL de acetato de amonio para análisis (CH₃COONH₄), de concentración 1 mol L⁻¹ y acidificado a pH 2 con HNO₃ Suprapur, sobre el sedimento enfriado y posteriormente se agitó mecánicamente a 150 traslaciones por minuto durante 16 horas.
 - Tras la agitación se centrifugaron los botes durante 30 minutos (a 4.000 rpm y 4 °C) y, una vez finalizado el proceso, se extrajo el líquido sobrenadante con una pipeta.

- Esta fase líquida extraída se conservó en botes perfectamente limpios de polietileno a 4 °C hasta su análisis.
 - El residuo remanente se lavó con 20 mL de agua Milli-Q agitando mecánicamente durante 15 minutos, con un posterior centrifugado durante 30 minutos a 4.000 rpm y 4 °C.
 - Finalizada la centrifugación se rechazó el agua de lavado sobrenadante y se conservó el residuo.
 - El residuo se secó en estufa a 40 °C hasta sequedad completa.
- Fase Residual o digestión ácida del residuo de la Fase III. Tras realizar todas las extracciones descritas previamente, continúa existiendo cierto contenido metálico que se encuentra ligado a los minerales y forma parte de la estructura cristalina de éstos. No obstante, la liberación de estos metales en periodos cortos de tiempo resulta altamente improbable, por lo que *a priori* es lógico pensar que no entrañan un grave peligro.

Para evaluar este metal se llevó a cabo una última digestión ácida pesando con exactitud unos 0,2 g del residuo remanente de la fase III. El sedimento se depositó en una placa de teflón y se sometió exactamente al mismo procedimiento que el que fue aplicado en el estudio del contenido metálico total del sedimento (apartado IV.B.2.3.1). La única variación que presentó es que, finalmente, la disolución filtrada se enrasó hasta un volumen final de 25 mL, en lugar de 50 mL, ya que la concentración de metal en este último extracto es menor que la obtenida en el estudio del contenido metálico total.

Por tanto, la aplicación del método de extracción secuencial propuesto por el BCR conduce a la obtención de tres fases líquidas y un residuo, el cual se somete a una última digestión ácida.

Las distintas disoluciones obtenidas de cada una de las fases fueron analizadas por espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

Cabe destacar que el porcentaje de metal obtenido en cada una de las fracciones varía según diferentes factores, como pueden ser la magnitud de la contaminación de los sedimentos, las propiedades de los metales y la competición entre su adsorción en el sedimento o la formación de complejos, donde los enlaces son mucho más fuertes, y dependerán del tipo y concentración de los ligandos presentes en el sedimento. Otros factores a destacar son variables como el pH, el potencial redox, la temperatura y el régimen de humedad. El estado de equilibrio entre fases puede verse afectado por la modificación de uno o varios de estos parámetros, pudiendo producirse transferencias del metal de unas a otras [González y col., 2009].

IV.B.2.3.2.1. Análisis de blancos, límites de detección y validación de la metodología empleada para los análisis de especiación en sedimentos

➤ Análisis de los blancos y determinación de los límites de detección

Para estos estudios se prepararon y analizaron 4 blancos de preparación, empleando el método de extracción secuencial BCR anteriormente descrito. En las Tablas IV.B.7 y IV.B.8 se muestran respectivamente los límites de detección y las concentraciones de los blancos para las distintas fases analizadas. La técnica de análisis empleada fue el ICP-MS.

Tabla IV.B.7. Límites de detección para los metales Zn, Cd, Pb y Cu en las distintas fases del método BCR medidos por ICP-MS ($n_{L.D.}=10$)

Metal	Límite de detección (L.D.) ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
Zn	0,591	2,114	1,645	1,152
Cd	0,061	0,204	0,074	0,056
Pb	0,467	0,274	0,205	0,127
Cu	0,288	0,686	0,528	0,342

Tabla IV.B.8. Valores de concentración media obtenidos en el análisis de muestras de blancos para cada fase del estudio de especiación metálica de sedimentos por ICP-MS ($n_{blancos}=4$)

Metal	Concentración media de los blancos \pm S.D. ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
Zn	<L.D.	<L.D.	$2,86 \pm 0,09$	$13,29 \pm 2,05$
Cd	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
Pb	<L.D.	$2,27 \pm 0,74$	$1,34 \pm 0,16$	$2,12 \pm 0,50$
Cu	$0,50 \pm 0,08$	<L.D.	<L.D.	$1,98 \pm 0,28$

➤ Validación del método mediante una muestra de referencia

La validación de la aplicación del método propuesto por el BCR se realizó mediante la utilización de la muestra de referencia certificada de sedimento de lago (BCR-CRM 701) que utiliza este método en la certificación de su composición (Tabla IV.B.9).

Mediante comparación de los valores obtenidos para cada metal con los valores en el sedimento de referencia (proporcionados para cada una de las tres fases), se contrastó la fiabilidad del proceso de medida con porcentajes de recuperación bastante satisfactorios. La validación de la fase residual resulta equiparable a la realizada para el contenido total del sedimento por emplearse el mismo método.

Tabla IV.B.9. Validación del método de análisis por especiación según el procedimiento de extracción secuencial BCR empleando la muestra de referencia certificada de sedimento de lago *BCR-CRM 701* ($n=4$)

Fase	Metal	Valor observado (mg kg ⁻¹)	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Recuperación (%)
Fase I	Zn	194,16 ± 4,99	205 ± 6	94,7
	Cd	7,39 ± 0,11	7,34 ± 0,35	100,7
	Pb	2,86 ± 0,42	3,18 ± 0,21	89,9
	Cu	57,69 ± 5,24	49,3 ± 1,7	117,0
Fase II	Zn	107,11 ± 8,06	114 ± 5	94,0
	Cd	3,61 ± 0,21	3,77 ± 0,28	95,8
	Pb	118,63 ± 8,33	126 ± 3	94,2
	Cu	91,52 ± 4,02	124 ± 3	73,8
Fase III	Zn	47,24 ± 0,60	45,7 ± 4	103,4
	Cd	0,29 ± 0,04	0,27 ± 0,06	107,4
	Pb	8,74 ± 1,48	9,3 ± 2	94,0
	Cu	55,85 ± 8,65	55,2 ± 4	101,2

IV.B.2.4. Contenido metálico de Zn, Cd, Pb y Cu en muestras biológicas

Las muestras biológicas analizadas en estos estudios fueron tejidos de branquias, hígado y músculo extraídos de distintas especies de peces (lenguados, rascacios, rubios y sargos), en los cuales se determinaron los contenidos totales de Zn, Cd, Pb y Cu. Estos tejidos diseccionados fueron sometidos a un pretratamiento de liofilización antes de su digestión ácida.

Este proceso constó de tres etapas: *precongelación* durante un periodo de 3 horas hasta alcanzar -55 °C, *dsecación primaria* durante 18 horas hasta alcanzar -40 °C, mediante la cual se eliminó la mayor parte del agua existente en las muestras, y *dsecación secundaria* en la que se eliminó toda el agua, incluyendo el agua intersticial presente en los tejidos (durante 22 horas alcanzando una temperatura de 14 °C). La

Figura IV.B.6 muestra un esquema del ciclo de liofilización empleado en el pretratamiento de las muestras de tejidos de peces.

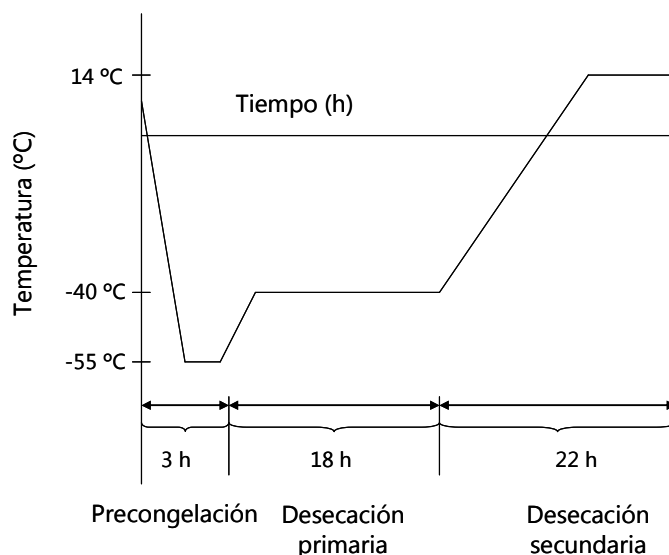


Figura IV.B.6. Esquema del ciclo de liofilización aplicado a las muestras biológicas

Después de la liofilización, se digirieron las muestras para su posterior análisis por ICP-MS. Los principales tipos de digestión utilizados para estas muestras son: digestión ácida y calentamiento a presión ambiental [Zhou y col., 1998; Gladyshev y col., 2001; Mzimela y col., 2003], digestión ácida a alta presión mediante el empleo de reactores de teflón [Rashed, 2001; Soltan y col., 2005] y digestión ácida asistida por microondas [Aucoin y col., 1999; Karadede y Ünlü, 2000; Pyle y col., 2005]. Además, es frecuente emplear HNO_3 o una mezcla de HNO_3 y HClO_4 en distintas relaciones de volumen. En la digestión asistida por microondas se suele emplear HNO_3 y en ocasiones se combina con el efecto oxidante del H_2O_2 .

En el presente estudio, se emplearon dos métodos de digestión ácida optimizados y basados en el uso de microondas, uno específico para los tejidos de branquias y músculo (Método 1) y otro para los tejidos de hígado (Método 2):

- Método 1: Se emplearon 7 mL de HNO_3 Suprapur.
- Método 2: Se utilizaron 4 mL de HNO_3 y 2 mL de H_2O_2 (ambos de calidad Suprapur), por tener estos tejidos un mayor contenido en grasas.

Se pesaron cantidades comprendidas entre 0,1 y 0,3 g de peso seco de cada tejido. Para llevar a cabo la digestión ácida mediante microondas, se empleó un programa que constaba de tres etapas: una primera a una potencia de 200 vatios durante 4 minutos; una segunda etapa a 400 vatios durante 5 minutos; y una tercera etapa a 600 vatios durante 10 minutos. La temperatura fue controlada durante todo el proceso, evitando exceder los 200 °C. Una vez digeridas y enfriadas las muestras, se enrasaron en un matraz de 25 mL con agua Milli-Q. Posteriormente, se conservaron estas muestras líquidas en botes de poliestireno hasta su análisis.

IV.B.2.4.1. Análisis de blancos, límites de detección y validación de la metodología empleada para los análisis del contenido metálico total en muestras biológicas

➤ Análisis de los blancos y determinación de los límites de detección

Antes de proceder a la validación y aplicación del método, se realizaron 10 blancos de preparación correspondientes a cada uno de los métodos de digestión empleados, y se establecieron los valores para los límites de detección de la técnica ICP-MS para ambos métodos de digestión por microondas (Tabla IV.B.10).

Tabla IV.B.10. Límites de detección y concentración media de las muestras de blancos para Zn, Cd, Pb y Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$) en el análisis de branquias (B) y músculo (M) (Método 1) e hígado (H) (Método 2) mediante digestión ácida asistida por microondas y análisis por ICP-MS ($n=10$)

Metal	Límite de detección (L.D.) ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Concentración media del blanco \pm S.D. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	Método 1 (B y M)	Método 2 (H)	Método 1 (B y M)	Método 2 (H)
Zn	1,706	0,327	$4,34 \pm 2,18$	$4,32 \pm 0,32$
Cd	0,011	0,013	<L.D.	<L.D.
Pb	0,163	0,076	<L.D.	$0,26 \pm 0,16$
Cu	0,200	0,213	$0,41 \pm 0,16$	$0,43 \pm 0,24$

➤ Validación del método mediante muestras de referencia

Para efectuar la validación de esta metodología, empleada en el análisis del contenido de metal total en muestras de distintos tejidos de peces, se emplearon dos

muestras de referencia adquiridas a través de la *National Research Council Canada/Conseil national de recherches Canada*: *DORM-2* (dogfish muscle Certificated Reference Material for Trace Metals) y *DOLT-3* (dogfish liver Certificated Reference Material for Trace Metals). La muestra *DORM-2* fue empleada para la validación del método de digestión por microondas aplicado a los tejidos de branquias y músculo (Método 1), mientras que la muestra de referencia *DOLT-3* se empleó para validar el método de digestión ácida por microondas empleado para los tejidos de hígado (Método 2).

En la Tabla IV.B.11 y la Tabla IV.B.12 se detallan los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de referencia. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron muy satisfactorios (>92%), justificando de esta manera la utilización de esta metodología en el análisis de las muestras de peces. Hay que señalar que el valor certificado de Pb para la muestra *DORM-2* se encontró por debajo del límite de detección de la técnica.

Tabla IV.B.11. Validación del método de análisis del contenido metálico total en músculo empleando la muestra de referencia certificada *DORM-2* (músculo de la especie pintarroja) ($n=9$; método de digestión 1)

Metal	Valor observado (mg kg ⁻¹)	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Recuperación (%)
Zn	25,19 ± 1,47	25,6 ± 2,3	98,4
Cd	0,044 ± 0,001	0,043 ± 0,008	103,5
Pb	0,067 ± 0,010 (<LD)	0,065 ± 0,007	103,1
Cu	2,17 ± 0,08	2,34 ± 0,16	92,9

Tabla IV.B.12. Validación del análisis del contenido metálico total en hígado a través del estudio de la muestra de referencia certificada *DOLT-3* (hígado de la especie pintarroja) ($n=8$; método de digestión 2)

Metal	Valor observado (mg kg ⁻¹)	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Recuperación (%)
Zn	84,07 ± 3,39	86,6 ± 2,4	97,1
Cd	18,92 ± 1,20	19,4 ± 0,6	97,5
Pb	0,300 ± 0,027	0,319 ± 0,045	94,0
Cu	29,81 ± 2,49	31,2 ± 1,0	95,5

IV.B.2.5. Tratamiento estadístico de los datos

Con el objetivo de estudiar las diferencias espaciales y temporales en el contenido metálico en agua, sedimentos y peces, así como estudiar las diferencias en el contenido metálico entre las especies estudiadas y tejidos seleccionados se aplicó el análisis de la varianza a los resultados obtenidos. Así mismo, para estudiar la relación existente entre las variables estudiadas se aplicaron análisis de correlación.

Para la realización de estos análisis estadísticos se verificó la hipótesis de normalidad de varianzas mediante el test de Shapiro-Wilk o bien el test de Kolmogorov-Smirnov. El primer estadístico se emplea para distribuciones de datos pequeñas ($n < 30$) mientras que el segundo se utiliza en aquellas distribuciones con un gran número de datos ($n > 30$). Para verificar el supuesto de homogeneidad de las varianzas se utilizaron el test de Levene y el test de Brown & Forsythe. En los casos en los que no se obtuvo normalidad se procedió a realizar una transformación matemática de los datos, con el fin de conseguir datos normales cuando fuera posible.

En función del tipo de distribución de los datos, paramétrica o no paramétrica, se han empleado los estadísticos paramétricos del análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y el análisis de correlación de Pearson o los estadísticos no paramétricos de Kruskal-Wallis (ANOVA), análisis de comparación múltiple y análisis de correlación de Spearman. El grado de significación adoptado para evaluar estos análisis fue de $p < 0,05$.

El software empleado para el tratamiento estadístico de los datos de concentración metálica en agua, sedimentos y peces obtenidos en estos estudios fue el programa Statistica 7.0 (stat Soft. Inc., 2004).

IV.B.3. Selección de los puntos de muestreo

Al igual que la toma de muestra, la selección de los puntos de muestreo es de suma importancia y debe asegurar la representatividad de la muestra con respecto a la población de la cual es obtenida. Conviene que las muestras que vayan a ser analizadas provengan de puntos estratégicos que reflejen la influencia o no de la proximidad entre éstos y las posibles fuentes de contaminación.

Obviamente, cuanto mayor sea el número de puntos de muestreo establecidos y mayor el número de muestreos realizados (frecuencia de muestreo), se conseguirá una mejor representatividad de los resultados. No obstante, al incrementarse el número de muestra recogidas, aumenta proporcionalmente el coste y el tiempo empleado en los análisis.

En base a esto, se seleccionaron un total de cinco puntos significativos en la Bahía de Algeciras, con características naturales y antrópicas diversas, para analizar de forma integral los diversos compartimentos ambientales mediante el estudio del contenido metálico total de Zn, Cd, Pb y Cu en muestras de aguas, sedimentos y peces, así como realizando la especiación química (fraccionamiento) en aguas y sedimentos de la bahía, con el fin de estudiar la relación entre los posibles vertidos de determinadas industrias ubicadas en la bahía y la presencia de estos metales pesados en el medio.

La situación de estos puntos de muestreo y su localización con respecto a las principales industrias de la zona pueden observarse geográficamente en la Figura IV.B.7, donde se muestran las estaciones de muestreo tanto en el mapa como en una imagen real de la zona de estudio. Seguidamente, se describen las principales características de cada punto que justificaron su selección.

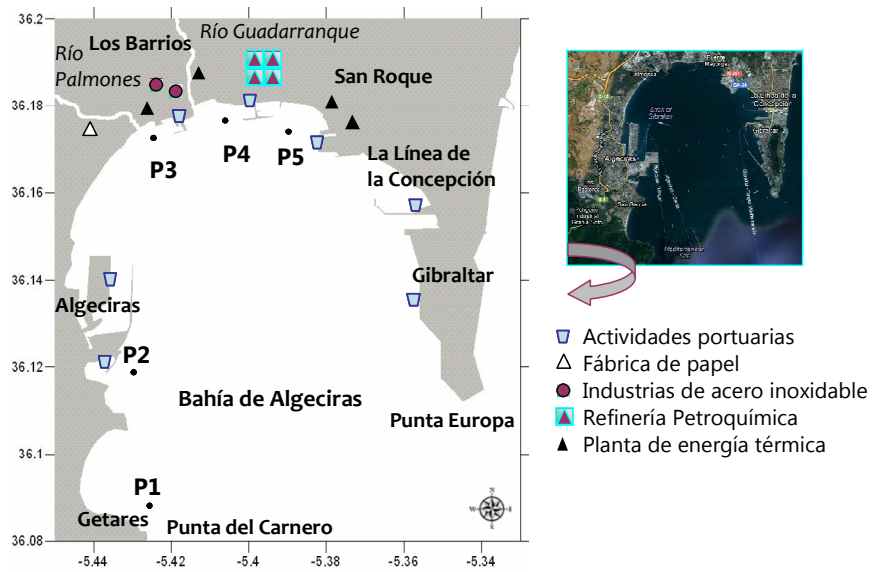


Figura IV.B.7. Situación de los puntos de muestreo (P1-P5) sobre el mapa (imagen superior) y sobre una imagen real (fotografía inferior) de la Bahía de Algeciras

- **Punto 1 (P1): Playa de Getares.** Es una zona alejada de las instalaciones industriales donde se espera una contaminación industrial más reducida, con aguas usualmente limpias. Esta playa, de 1.500 m de longitud, delimitada por Punta Carnero y Punta de San García, ha sido premiada varias veces con la Bandera Azul de los mares limpios de Europa [Catálogo de playas, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (<http://www.magrama.gob.es/es/cartografia-y-sig/>)]. Es por ello que, en este estudio de especiación metálica, fue considerada como punto de control.
- **Punto 2 (P2): Isla Verde.** Es una zona de previsible contaminación urbana por ser una zona de vertidos de aguas residuales urbanas. Hasta finales de 2011, las aguas residuales del municipio de Algeciras eran bombeadas para ser vertidas a la bahía sin ningún tipo de tratamiento a través de un emisario submarino, localizado a 1 km del muelle de Isla Verde en los terrenos de la Autoridad Portuaria [Actualización del Diagnóstico Ambiental de Algeciras, 2010; Rus Pezzi, 2011]. En ese año se puso en marcha una depuradora para el adecuado tratamiento de estas aguas. No obstante, los muestreos previos fueron realizados entre los años 2007-2009. Se encuentra frente al muelle de Isla Verde, en la ciudad de Algeciras. Además de las aguas no depuradas, esta zona sufre la contaminación procedente del tráfico marítimo del puerto de Algeciras.
- **Punto 3 (P3): Palmones.** La cercanía de la empresa de aceros inoxidables "Acerinox", la central térmica de Los Barrios y la desembocadura del Río Palmones y la fábrica de papel (operativa hasta el año 2009) hacen que la elección de este punto sea especialmente relevante en un estudio de posible contaminación por metales pesados.
- **Punto 4 (P4): Guadarranque.** Se considera un punto de gran interés por la desembocadura del Río Guadarranque, con posibles aportes urbanos, así como la existencia de la refinería petroquímica CEPESA y la central de ciclo combinado de San Roque II (Endesa), ubicadas en el Polígono Industrial Guadarranque. Además, esta zona puede verse afectada por actividades portuarias.
- **Punto 5 (P5): Puente Mayorga.** Esta estación de muestreo puede encontrarse influenciada por la presencia de las dos centrales de ciclo combinado ubicadas en esta zona (la central de ciclo combinado Bahía de Algeciras y la central de ciclo combinado Campo de Gibraltar), además de estar sujeta a una gran actividad portuaria, debida a la presencia de muelles y puertos en la zona.

En la Tabla IV.B.13 se detallan las distintas estaciones de muestreo con las coordenadas geográficas de los puntos donde se llevaron a cabo los distintos muestreos.

Tabla IV.B.13. Estaciones de muestreo y coordenadas geográficas de las mismas

Zona de muestreo	Denominación de los puntos de muestreo	Característica de la estación	Coordenadas	
			Norte	Oeste
Playa de Getares	P1	Control	36° 05' 28.31''	5° 26' 10.93''
Isla Verde	P2	Influencia aguas residuales urbanas	36° 07' 8.43''	5° 25' 37.60''
Palmones	P3	Próxima a empresa Acerinox, y central térmica	36° 10' 19.51''	5° 25' 27.14''
Guadarranque	P4	Próxima a refinería y central térmica	36° 10' 32.21''	5° 24' 27.47''
Puente Mayorga	P5	Próxima a centrales térmicas e instalaciones portuarias	36° 10' 32.23''	5° 23' 23.24''

Las fechas de las campañas en las que se realizaron los muestreos (Tabla IV.B.14) fueron planificadas con objeto de poder estudiar la variabilidad espacio-temporal relacionada con los ciclos biológicos de los organismos del medio. Así, se efectuaron un total de cuatro muestreos durante dos años consecutivos (2007-2009), tomándose las muestras de aguas, sedimentos y peces en los periodos de otoño-invierno y primavera-verano. Como ya se ha comentado, las muestras de aguas y sedimentos se tomaron conjuntamente desde la misma embarcación, mientras que la toma de muestra o captura de peces fue realizada de forma individual en fechas próximas, al ser llevada a cabo por personas expertas en pesca.

Tabla IV.B.14. Fecha de las campañas de toma de muestra de agua, sedimento y peces

Número de muestreo	Aguas y sedimentos	Peces
1	30/10/2007	13/11/2007
2	08/05/2008	30/04/2008
3	04/11/2008	21/10/2008
4	22/05/2009	19/05/2009

IV.B.4. Estudio de los parámetros físico-químicos en la Bahía de Algeciras

Los valores de los parámetros físico-químicos en un medio acuático pueden presentar variación entre distintas áreas dentro de un mismo ecosistema. Esto puede deberse a múltiples factores como los ciclos meteorológicos (destacando el régimen de precipitaciones), temperatura, radiación solar y viento, entre otros. Estos factores van a influir, a su vez, sobre el caudal de los aportes fluviales así como sobre su composición y producción biológica. Esto finalmente tendrá su influencia en aquellas zonas que reciban estas aguas.

Como se comentó en el apartado de introducción, el clima de esta zona se considera templado, de transición entre el mediterráneo y oceánico, con temperaturas suaves y regulares (temperatura media anual de 17 °C). En cambio, las precipitaciones son irregulares y pueden presentar carácter torrencial (media anual de 1.000 L m⁻²), concentrándose entre los meses de noviembre a marzo. Ampliando estos datos, en la Figura IV.B.8 se muestra el registro de precipitaciones durante los años en los que se realizaron los muestreos. Estos datos fueron obtenidos en la estación meteorológica más próxima a la Bahía de Algeciras, la estación de Tarifa [Boletín Hidrológico (<http://servicios2.marm.es/sia/visualizacion/descargas/series.jsp>)]. Mediante líneas discontinuas quedan representados los meses en los que se realizaron los muestreos, observándose que los aportes fluviales tuvieron lugar después de los muestreos primero y tercero (noviembre-2007 y noviembre-2008).

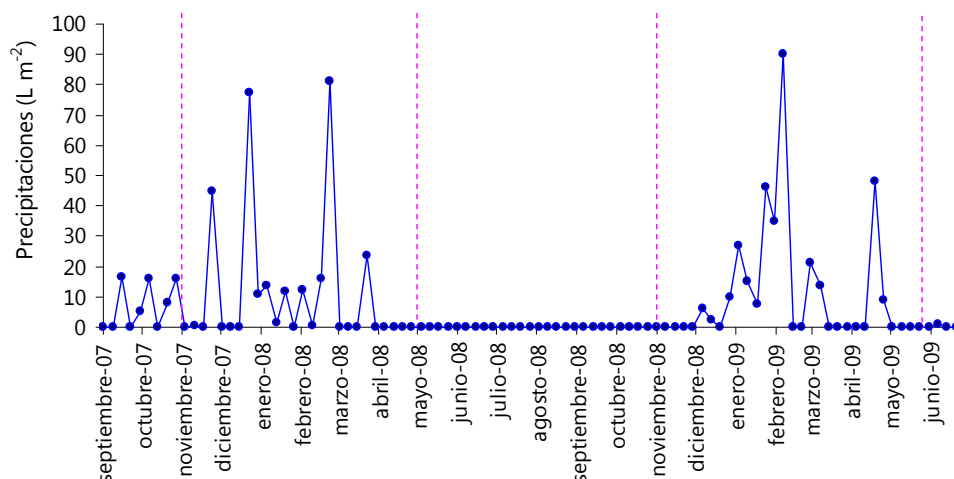


Figura IV.B.8. Precipitaciones semanales registradas en la estación meteorológica de Tarifa desde septiembre-2007 hasta junio-2009.

Los parámetros físico-químicos tanto de las aguas como de los sedimentos fueron determinados en cada muestra. Algunos de ellos fueron medidos sencillamente desde la propia embarcación (*in situ*), tras la recogida de las muestras, con el fin de evitar una posible variación con el tiempo. Otros, en cambio, fueron determinados en el laboratorio. Ambos tipos de parámetros se presentan divididos en los siguientes subapartados.

IV.B.4.1. Parámetros físico-químicos medidos *in situ* en la Bahía de Algeciras

Mediante el empleo de una sonda multiparamétrica portátil se midieron los valores de temperatura, pH, salinidad, sólidos disueltos totales (TDS), conductividad y oxígeno disuelto en las muestras de agua recién tomadas. En la Tabla IV.B.15 se resumen los resultados obtenidos, que se representan gráficamente en las figuras posteriores, con el fin de facilitar la visualización de dichos datos.

➤ Temperatura

La temperatura es una variable física importante con un papel fundamental en los ecosistemas acuáticos. Regula los procesos vitales de los organismos vivos y puede afectar a otros parámetros físico-químicos abióticos, como son la solubilidad y el estado físico de nutrientes, solubilidad de gases y de sales, densidad de las aguas, cinética de las reacciones, desplazamientos de equilibrios, etc. Todos estos factores tienen una influencia directa en cuanto a la distribución, diversidad y actividad metabólica de los seres vivos que integran un ecosistema.

La temperatura de una masa de agua depende fundamentalmente de la absorción de radiación en las capas superficiales y varía en función de la época del año, hora del día, profundidad del medio y el caudal en cuencas fluviales. Las variaciones de temperatura afectan a la solubilidad de sales y gases en el agua y, en general, a todas sus propiedades, tanto químicas como microbiológicas. La influencia más importante es la disminución de la solubilidad del oxígeno al aumentar la temperatura y la aceleración de los procesos de putrefacción [Marín Galván, 2003, Orozco-Barrenetxea y col., 2008].

Tabla IV.B.15. Parámetros físico-químicos medidos *in situ* en cada uno de los puntos de muestreo de la Bahía de Algeciras

Muestreo	Parámetro	Punto de muestreo				
		1	2	3	4	5
1	Temperatura (°C)	21,2	22,1	20,1	21,3	21,0
	pH	8,34	8,27	8,25	8,24	7,03
	Salinidad (‰)	35,6	35,5	37,2	35,2	34,4
	TDS (g L ⁻¹)	34,4	34,2	36,0	33,9	33,1
	Conductividad (mS cm ⁻¹)	54,1	53,8	56,4	53,3	52,3
	O ₂ disuelto (mg L ⁻¹)	4,0	4,1	4,0	4,0	4,1
	O ₂ disuelto (% saturación)	47,7	48,3	43,7	45,2	44,5
2	Temperatura (°C)	18,3	19,7	20,2	20,9	18,9
	pH	8,42	8,42	8,56	8,51	8,58
	Salinidad (‰)	34,8	33,9	32,4	33,8	33,5
	TDS (g L ⁻¹)	33,8	32,5	31,1	32,5	32,4
	Conductividad (mS cm ⁻¹)	52,8	51,6	49,6	51,5	51,3
	O ₂ disuelto (mg L ⁻¹)	6,6	7,0	6,9	6,9	6,9
	O ₂ disuelto (% saturación)	85,8	90,4	88,8	89,6	88,5
3	Temperatura (°C)	14,9	15,9	15,4	15,3	14,3
	pH	7,98	8,03	8,06	8,04	8,07
	Salinidad (‰)	32,9	32,8	32,2	31,2	32,4
	TDS (g L ⁻¹)	31,7	32,8	32,2	31,2	30,4
	Conductividad (mS cm ⁻¹)	50,3	51,7	51,0	49,6	48,5
	O ₂ disuelto (mg L ⁻¹)	5,7	5,4	4,7	5,3	4,6
	O ₂ disuelto (% saturación)	77,5	75,1	67,7	73,5	66,8
4	Temperatura (°C)	18,2	18,3	18,2	18,6	18,5
	pH	7,11	6,96	7,58	7,37	7,42
	Salinidad (‰)	30,1	29,3	30,3	29,5	29,7
	TDS (g L ⁻¹)	29,1	28,2	28,9	28,5	28,6
	Conductividad (mS cm ⁻¹)	47,0	45,4	46,6	45,5	45,6
	O ₂ disuelto (mg L ⁻¹)	7,5	7,2	7,9	7,5	7,7
	O ₂ disuelto (% saturación)	88,0	83,5	95,5	88,4	94,0

Los valores de temperatura obtenidos a lo largo de todas las campañas de muestreo se recogen en la Figura IV.B.9, presentando un mínimo de 14,3 °C y un máximo de 22,1 °C. No se observó estacionalidad alguna en los resultados, aunque las temperaturas más bajas fueron registradas durante el tercer muestreo (otoño de 2008), con un valor medio de 15,2 °C. Esta disminución se justifica si se tiene en cuenta que en noviembre de 2008 se alcanzaron temperaturas mucho más bajas que otros años, según la Agencia Estatal de Meteorología.

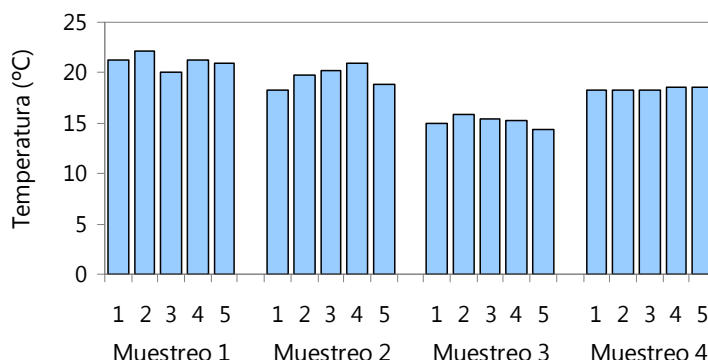


Figura IV.B.9. Temperatura de las aguas en los puntos de muestreo de la Bahía de Algeciras

➤ pH

La medida de este parámetro también se realizó *in situ* para evitar modificaciones de los equilibrios iónicos durante el transporte o almacenamiento de las muestras.

Este factor abiótico es muy importante en la especiación química, debido a que el pH influye en los equilibrios que presentan los metales pesados en los ecosistemas acuáticos, pudiendo modificar su movilidad y con ello la especiación de los compuestos de los que forman parte. Estos cambios pueden ocasionar aumentos en el efecto o toxicidad sobre los organismos, según la especie o forma química en que se encuentren los metales. Además, el pH interviene en procesos biológicos mediados por enzimas (como la fotosíntesis y respiración), e influye en la solubilidad de sustancias orgánicas e inorgánicas. Así, regula la disponibilidad de nutrientes esenciales que limitan el crecimiento microbiano en muchos ecosistemas (como NH_4^+ , PO_4^{3-} y Mg^{2+}). Variaciones bruscas en el valor del pH pueden llegar a ocasionar desequilibrios en las comunidades de organismos.

El agua oceánica es ligeramente alcalina, encontrándose valores de pH que oscilan entre 7,5 y 8,4. Estos valores varían en función de la temperatura, salinidad, presión, profundidad y actividad vital de los organismos marinos. Sin embargo, el valor de pH de un ecosistema acuático depende fundamentalmente del equilibrio carbónico (Figura IV.B.10) y de la actividad de los microorganismos implicados principalmente en regular la concentración de dióxido de carbono en las aguas. La actividad fotosintética provoca una disminución de la concentración de CO_2 en el medio, y por tanto, un aumento del

pH; mientras que la respiración de organismos heterótrofos produce un aumento de CO_2 y un efecto contrario, es decir, una disminución del pH [Marín-Galván, 2003].

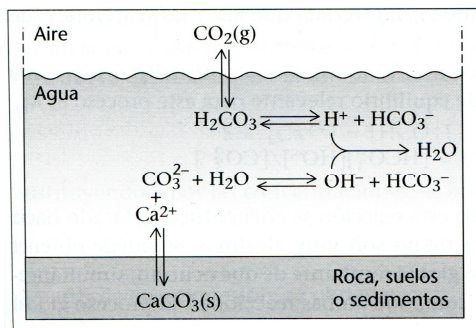


Figura IV.B.10. Equilibrios trifásicos en el sistema CO_2 /carbonato existentes en ecosistemas acuáticos

Los valores de pH imperativos establecidos por la Junta de Andalucía para aguas normales (clasificación de las aguas muestreadas según el BOJA núm. 27, de 1997) se encuentran en el rango de 6 a 9. En la Figura IV.B.11 se representan los valores de pH encontrados en las aguas de todos los puntos de muestreo estudiados. En todos ellos, se encontraron valores habituales para las aguas naturales, oscilando entre 7,0 y 8,6. Puede observarse que para la última campaña de muestreo estos valores fueron ligeramente más bajos, aunque no pudo atribuirse esta disminución a ninguna variación estacional, ya que en el segundo muestreo no ocurrió así.

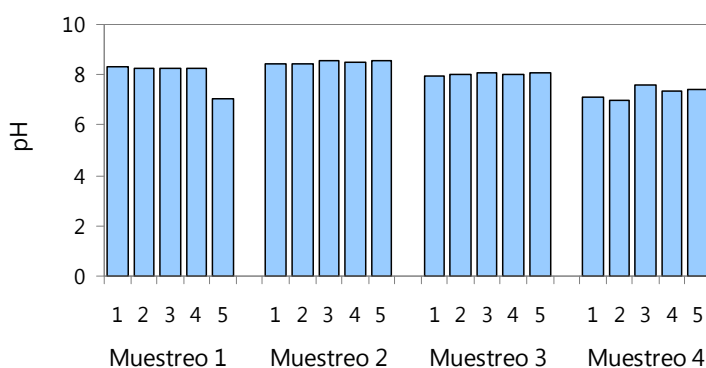


Figura IV.B.11. Valores de pH de las aguas en los puntos de muestreo de la Bahía de Algeciras

➤ **Conductividad, Salinidad y Sólidos totales disueltos**

Estos parámetros se encuentran relacionados entre sí, es decir, existe una correlación directa entre los tres términos, de manera que cuanto mayor sean los sólidos disueltos totales o la salinidad, mayor será la conductividad. La conductividad (en mS cm^{-1}) es la capacidad de una disolución de conducir la corriente eléctrica y se entiende como la concentración iónica total que tiene una disolución. Los sólidos disueltos totales (TDS) son una medida de las sustancias orgánicas e inorgánicas, en forma molecular, ionizada o micro-granular, que contiene el agua. Para considerarse TDS, las sustancias deben ser lo suficientemente pequeñas como para pasar una filtración del tamaño de dos micras. La salinidad es el contenido de sales minerales disueltas en un cuerpo de agua. Cuando estas sales permanecen en disolución se ionizan y forman cationes (sodio, potasio, calcio, magnesio, etc.) y aniones (cloruros, carbonatos, bicarbonatos, nitratos, fosfatos,...), los cuales conducirán la electricidad por tratarse de sustancias cargadas eléctricamente. El porcentaje de salinidad medio que existe en los océanos es de 35 ‰ (35 gramos de sales por cada litro de agua), siendo su anión y catión mayoritarios el Cl^- y Na^+ , respectivamente [Orozco-Barrenetxea y col., 2008].

En el *Anexo II* de la *Orden de 14 de febrero de 1997* (BOJA nº 27, de 1997) se establecen ciertos objetivos de calidad para estos parámetros en aguas litorales andaluzas. Así, la salinidad, debe presentar un rango de variación cuyos valores son función de un valor de salinidad de referencia (medido en aguas no afectadas por vertidos). En este estudio, la estación de referencia seleccionada fue el primer punto de la Playa de Getares. Para aguas consideradas normales, el valor imperativo de salinidad/conductividad según estos objetivos de calidad es de 0,9 MN-1,1 MN, donde MN es el valor medio normal de la conductividad en el punto limpio o zona de referencia no afectada. Tomando los valores de conductividad registrados en el punto de Getares y utilizando dichos factores (0,9 y 1,1), se definieron los intervalos de conductividad dentro de los cuales debían encontrarse los valores medidos en los restantes puntos de muestreo (Tabla IV.B.16).

Tabla IV.B.16. Valores imperativos de conductividad según los objetivos de calidad de la Orden de 14 de Febrero de 1997 (Anexo II) para aguas litorales andaluzas, tomando como referencia los valores del punto Playa de Getares en cada muestreo

Muestreo	Conductividad referencia x 0,9 (mS cm ⁻¹)	Conductividad referencia x 1,1 (mS cm ⁻¹)
1	48,69	59,51
2	47,52	58,08
3	45,27	55,33
4	42,30	51,70

En la Figura IV.B.12 se representan gráficamente los valores de conductividad obtenidos en cada punto para cada muestreo realizado, comprobándose que éstos se encontraron dentro de los valores imperativos establecidos por la Junta de Andalucía, indicados en la tabla anterior. Asimismo, en las Figuras IV.B.13 y IV.B.14 se muestran los valores correspondientes a la salinidad y sólidos disueltos totales. Cabe destacar que los valores más bajos se obtuvieron en el último muestreo, con valores medios de 46 mS cm⁻¹ de conductividad, 30 ‰ de salinidad y 29 g L⁻¹ de sólidos totales disueltos. No obstante, no se observaron diferencias importantes entre los distintos puntos de muestreo y la ubicación temporal de cada muestreo realizado. Los valores medios totales aproximados fueron 50 mS cm⁻¹, 33 ‰ y 32 g L⁻¹, encontrándose dentro de los rangos habituales para aguas normales naturales.

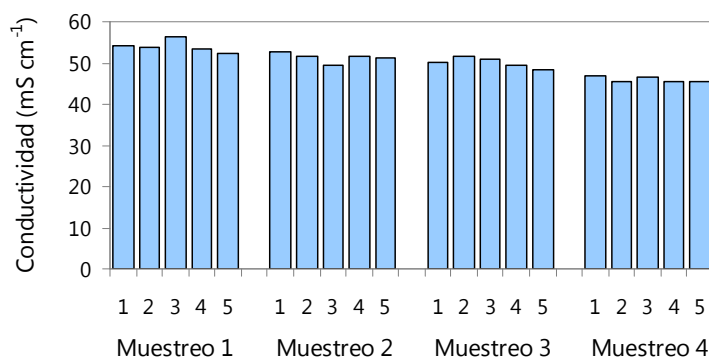


Figura IV.B.12. Valores de conductividad en las aguas estudiadas

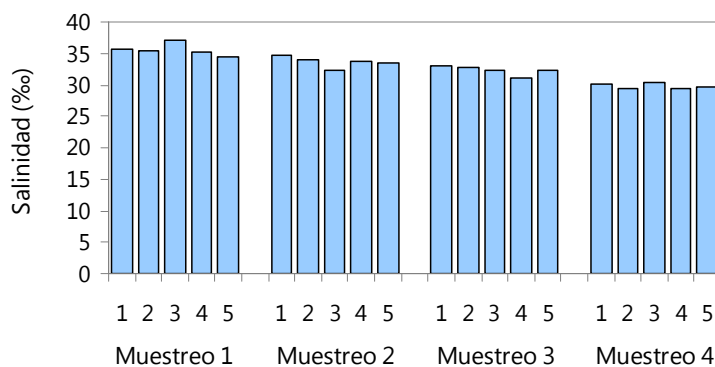


Figura IV.B.13. Valores de salinidad en las aguas estudiadas

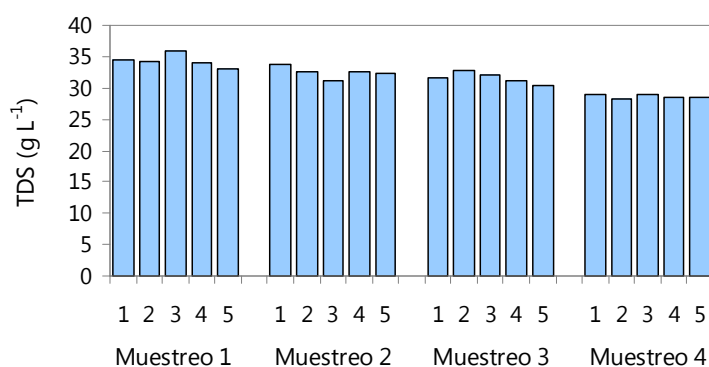


Figura IV.B.14. Valores de sólidos disueltos totales en las aguas estudiadas

➤ Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto es uno de los parámetros no conservativos más estudiados en los ecosistemas acuáticos. Constituye un elemento fundamental para el desarrollo y mantenimiento de organismos vivos (respiración aeróbica, generación de energía, fijación de nutrientes en la célula, etc.). Además, interviene en otros procesos importantes como fotosíntesis, reacciones de oxidación-reducción, solubilidad de minerales y descomposición de la materia orgánica. La concentración de oxígeno en la

columna de agua es variable, por lo que las especies acuáticas se irán distribuyendo en función de éste y del que necesiten para vivir y reproducirse adecuadamente. La distribución del oxígeno en ecosistemas acuáticos naturales está determinada principalmente por el intercambio gaseoso a través de la superficie del agua, producción de oxígeno por organismos fotosintéticos y consumo por respiración aerobia, y procesos físicos de advección (movimientos de aire causados por variaciones de presión atmosférica).

La cantidad de oxígeno disuelta en agua varía en función de la temperatura, salinidad y presión atmosférica, entre otros. Así, el porcentaje de saturación de oxígeno está relacionado inversamente con la temperatura y salinidad de las aguas. Se puede indicar que a una presión atmosférica dada, las aguas frías tendrán una mayor concentración de oxígeno que aguas tibias o calientes. En cualquier caso, esta relación inversa puede verse modificada por fenómenos como la fotosíntesis y/o la respiración. Es frecuente encontrar este parámetro como indicador cualitativo sobre la calidad de cuerpos de agua, siempre y cuando no se encuentren presentes compuestos tóxicos que obvien la contaminación de las aguas (como pesticidas o metales pesados). Así, concentraciones de oxígeno altas pueden ser debidas a una alta tasa de actividad fotosintética, la cual puede traducirse en la formación de burbujas en superficie o afectar directamente al metabolismo de los organismos acuáticos. Por otro lado, concentraciones bajas de oxígeno pueden poner de manifiesto que existe contaminación por exceso de materia orgánica o una alta tasa de actividad respiratoria. Las aguas superficiales no contaminadas suelen estar saturadas en oxígeno, con concentraciones que oscilan entre los 6,5 y 8 mg L⁻¹. Valores por debajo de 5 mg L⁻¹ pueden afectar a los hábitats de comunidades y niveles inferiores a 2 mg L⁻¹ causan incluso la muerte de peces y otros organismos marinos.

La concentración de oxígeno disuelto se puede expresar también en términos de porcentaje de saturación de oxígeno en agua, siendo el valor imperativo para aguas normales del 70% según la legislación ambiental andaluza (*Anexo II, Orden de 14 de Febrero de 1997*).

En la Figura IV.B.15 se muestran los valores de oxígeno disuelto (en mg L⁻¹) en las distintas muestras de agua. Destacan las bajas concentraciones de oxígeno disuelto en los muestreos 1 y 3 (octubre 2007 y noviembre 2008), los cuales fueron realizados en otoño. Los valores medios de oxígeno disuelto en cada muestreo, expresados en unidades de mg L⁻¹, fueron 4,05±0,04 / 6,84±0,18 / 5,13±0,48 / 7,56±0,27 respectivamente, y como % de saturación, 45,9±2,0 / 88,6±1,7 / 72,1±4,7 / 89,9±4,9. De estos últimos datos, se observa que el valor medio del primer muestreo presentó un valor por debajo del 70%, dato establecido como valor imperativo por la Junta de Andalucía. La media del tercer muestreo no estuvo por debajo de este valor, aunque sí

lo estuvieron algunos valores individuales en ciertos puntos de muestreo. Estos datos mostraron indicios de la existencia de procesos de degradación de la materia orgánica, los cuales tuvieron como consecuencia dicho grado de hipoxia en las aguas en los muestreos 1 y 3. Así, la tendencia estacional observada, con valores mayores de oxígeno disuelto en los meses de primavera, se encontraba en consonancia con los datos publicados anteriormente [Plan de calidad ambiental del campo de Gibraltar, 2005], según los cuales los máximos de los procesos fotosintéticos en las costas de la Bahía de Algeciras se producen fundamentalmente en la época estival, principalmente de abril a julio.

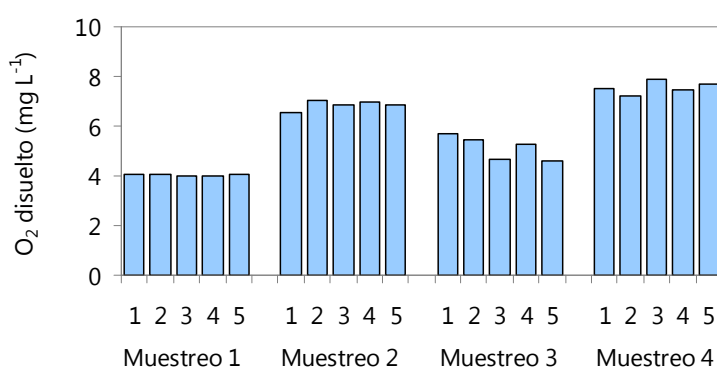


Figura IV.B.15. Concentración de oxígeno disuelto (mg L^{-1}) en las aguas estudiadas

IV.B.4.2. Parámetros físico-químicos medidos en el laboratorio

Además de los parámetros anteriores determinados *in situ*, se midieron otros parámetros generales en el laboratorio (metodología descrita en el apartado IV.B.2.1). En la Tabla IV.B.17 se muestran los resultados obtenidos para la densidad del agua, la materia en suspensión en las aguas, el contenido de materia orgánica en dicha materia en suspensión, el carbono orgánico disuelto y el contenido de materia orgánica en sedimentos (Figuras IV.B.16, IV.B.17, IV.B.18, IV.B.19 y IV.B.20).

Tabla IV.B.17. Valores de los parámetros físico-químicos de las aguas muestreadas en la Bahía de Algeciras

Muestreo	Parámetro	Punto de muestreo				
		1	2	3	4	5
1	Densidad del agua (g mL ⁻¹)	1,026	1,024	1,028	1,026	1,017
	Materia en suspensión en agua (g L ⁻¹)	0,027	0,024	0,024	0,032	0,040
	Materia orgánica en materia en suspensión (%)	32,9	17,2	26,5	25,7	35,0
	COD en agua (mg L ⁻¹)	1,72	1,52	1,39	1,53	6,23
	Materia orgánica en los sedimentos (%)	16,1	17,8	12,3	11,6	10,2
2	Densidad del agua (g mL ⁻¹)	1,026	1,025	1,025	1,026	1,026
	Materia en suspensión en agua (g L ⁻¹)	0,014	0,015	0,016	0,015	0,016
	Materia orgánica en materia en suspensión (%)	12,8	18,2	13,4	20,2	19,0
	COD en agua (mg L ⁻¹)	0,41	0,59	0,67	0,72	0,56
	Materia orgánica en sedimentos (%)	2,6	5,3	1,8	1,7	1,5
3	Densidad del agua (g mL ⁻¹)	1,024	1,025	1,024	1,032	1,027
	Materia en suspensión en agua (g L ⁻¹)	0,029	0,017	0,022	0,024	0,019
	Materia orgánica en materia en suspensión (%)	19,4	12,6	17,9	21,4	17,8
	COD en agua (mg L ⁻¹)	1,74	1,03	0,66	1,67	1,52
	Materia orgánica en los sedimentos (%)	4,1	7,6	6,8	7,6	15,7
4	Densidad del agua (g mL ⁻¹)	1,025	1,025	1,025	1,024	1,024
	Materia en suspensión en agua (g L ⁻¹)	0,021	0,022	0,023	0,022	0,020
	Materia orgánica en materia en suspensión (%)	12,8	16,1	14,6	12,6	7,1
	COD en agua (mg L ⁻¹)	0,92	2,51	0,41	1,05	1,14
	Materia orgánica en los sedimentos (%)	3,1	5,7	2,4	4,5	4,4

➤ Densidad del agua

La densidad del agua salada suele ser mayor que la del agua pura ($1,000 \text{ g mL}^{-1}$) debido a que ésta contiene sales minerales disueltas y otras sustancias. La densidad del agua de los océanos, en su superficie, es de aproximadamente $1,027 \text{ g mL}^{-1}$. Es una propiedad importante, ya que la densidad puede influir sobre las corrientes marinas. Existen dos factores principales que hacen que el agua de los océanos sea más o menos densa: la temperatura y la salinidad del agua.

El cálculo de este parámetro se hizo necesario para poder transformar en volumen (mL) una cantidad de agua pesada (g), para su uso en los cálculos de la materia en suspensión y de la cantidad de materia orgánica presente en la misma. La determinación de la densidad del agua se hizo mediante pesada de un volumen exacto (10 mL) de agua procedente de cada punto. En la Figura IV.B.16 se muestran todos los valores, que fueron prácticamente constantes y normales para este tipo de aguas a lo largo de todos los puntos y muestreos realizados.



Figura IV.B.16. Valores de densidad en las aguas estudiadas

➤ Materia en suspensión

La existencia de materia o sólidos en suspensión en una masa de agua tiene como consecuencia la apariencia de turbidez o pérdida de transparencia. Se considera materia en suspensión a toda materia particulada -orgánica o inorgánica- presente en el agua. Estos Sólidos en Suspensión (SS) se definen como la fracción de sólidos que quedan retenidos, tras someter el agua a filtración empleando filtros de tamaño de poro de $0,45 \mu\text{m}$. Estas pequeñas partículas se encuentran en contacto constante con el

fluido, el cual contrarresta la fuerza gravitatoria provocando que se mantengan suspendidas en la columna de agua.

El aporte de estos sólidos en suspensión al medio marino puede provenir de diversas fuentes. Gran parte de esta materia puede deberse a causas antropogénicas (vertidos de diversa naturaleza). Otra parte puede provenir de fuentes naturales (como sedimentos, microorganismos, etc.) El viento y el oleaje son factores que pueden favorecer la suspensión de materia, así como fenómenos de resuspensión de sedimentos y agrupación-decantación de partículas en el seno del agua. Por último, las descargas fluviales también pueden aportar sólidos en suspensión al medio.

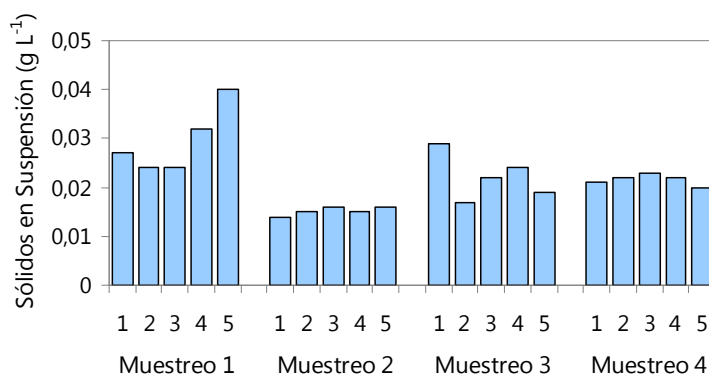
Con objeto de determinar este parámetro, se filtraron a vacío porciones de aguas conocidas (200-250 g) tomadas en los distintos puntos de muestreo. Estos filtros previamente secados y pesados fueron secados nuevamente (tras el proceso de filtración) a una temperatura de 103-105 °C hasta peso constante [Orozco-Barrenetxea y col., 2008]. Así, y mediante los cálculos correspondientes, se obtuvieron los valores de sólidos en suspensión en estas aguas.

La normativa referente a la calidad de las aguas litorales andaluzas hace alusión a este parámetro, estableciendo unos valores límites determinados respecto a una zona de referencia, libre de vertidos. De esta forma, la Junta de Andalucía establece 1,2 MN como valor imperativo de sólidos en suspensión para aguas normales, siendo MN el valor medio en aguas no afectadas o de referencia. Como ya se ha comentado, el punto considerado como zona libre de vertidos fue la Playa de Getares. En la Tabla IV.B.18 se encuentran los valores imperativos para cada uno de los muestreos.

Los datos de sólidos en suspensión para los distintos puntos y campañas de muestreo se recogen gráficamente en la Figura IV.B.17. Globalmente, los datos de sólidos en suspensión estuvieron dentro del rango de 0,014 a 0,040 g L⁻¹, con una mayor variabilidad en los muestreos 1 y 3. Los valores más altos fueron los correspondientes al primer muestreo y los más bajos al segundo (con un valor medio de 0,015 g L⁻¹). En todos los casos los datos no sobrepasaron el valor imperativo, excepto para el último punto de muestreo (Puente Mayorga) del primer muestreo, que fue algo superior (0,040 frente al valor de 0,032 g L⁻¹). Comparando estos valores con los encontrados en ecosistemas acuáticos próximos, como la Bahía de Cádiz [Vicente-Martorell y col., 2009] donde los valores oscilan alrededor de 0,025 g L⁻¹, se obtienen cifras similares de sólidos en suspensión.

Tabla IV.B.18. Valores imperativos de sólidos en suspensión según los objetivos de calidad de la Orden de 14 de Febrero de 1997 (Anexo II) para aguas litorales andaluzas

Muestreo	Valor referencia de SS x 1,2 (g L ⁻¹)
1	0,032
2	0,017
3	0,035
4	0,025

**Figura IV.B.17.** Contenido de sólidos en suspensión en las aguas estudiadas

➤ **Materia orgánica en materia en suspensión**

La materia orgánica presente en el agua suele ser altamente biodegradable y los microorganismos la utilizan como alimento, necesitando oxígeno para ello. En consecuencia, la concentración de oxígeno disuelto en el agua disminuye hasta alcanzar niveles de anaerobiosis. Por tanto, la presencia de materia orgánica en ecosistemas acuáticos puede derivar en la degradación y mal estado de las aguas (malos olores, coloración gris o negra, mortalidad de organismos, etc.) La materia orgánica puede tener un origen vegetal o animal, aunque la mayor parte de ella proviene de productos de desecho vertidos por el hombre.

El contenido de materia orgánica presente en la materia suspendida se evaluó en los mismos filtros de nylon empleados para determinar la materia en suspensión. Estos filtros, con la materia en suspensión retenida, fueron calcinados a altas temperaturas (550 °C) en horno de mufla durante 3 horas. El porcentaje de materia orgánica en la materia en suspensión se calculó a partir de la pérdida de peso observada durante la calcinación (ya que la materia orgánica pasa a transformarse en CO₂, N₂ y H₂O).

La Figura IV.B.18 muestra los valores de materia orgánica en la materia en suspensión, observándose que éstos presentan una tendencia algo similar a la materia en suspensión (Figura IV.B.17). El primer muestreo presentó los valores más altos (con una media de 27,5%), mientras que fue el cuarto muestreo el que mostró los más bajos (12,7%), siendo las medias del segundo y tercer muestreo 16,7 y 17,8%, respectivamente. A su vez, estos datos presentaron una tendencia inversa a la que presentaba la concentración de oxígeno disuelto. Así, la elevada cantidad de materia orgánica en las aguas puede justificar los menores valores de oxígeno disuelto en el primer muestreo. En el muestreo 4, los niveles de oxígeno disuelto fueron mayores, asociados a una menor cantidad de materia orgánica en las aguas de esta zona. Hay que indicar que el contenido de materia orgánica fue similar al encontrado en aguas próximas como las de la Bahía de Cádiz [Vicente-Martorell y col., 2009].

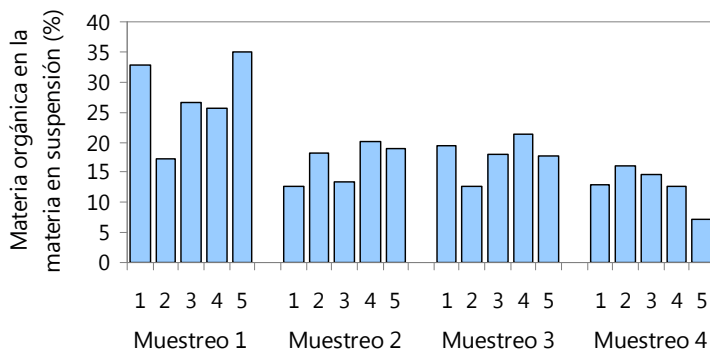


Figura IV.B.18. Contenido de la materia orgánica en la materia en suspensión de las aguas estudiadas

➤ **Carbono orgánico disuelto**

La cantidad de carbono orgánico presente en el agua es un indicador de la exposición del medio a contaminantes orgánicos en descomposición (ácidos húmico y fúlvico, aminas, urea, etc.), así como a compuestos químicos sintéticos (detergentes, herbicidas, fertilizantes, insecticidas, etc.).

El contenido en carbono orgánico disuelto (COD) fue determinado a partir de muestras de agua, filtradas y acidificadas, empleando para ello el equipo analizador de carbono descrito en el apartado IV.B.2.1.

Este parámetro osciló entre 0,41 y 6,23 mg L⁻¹, siguiendo los datos medios para cada muestreo el siguiente orden: muestreo 1 (2,48 mg L⁻¹) > muestreo 3 (1,32 mg L⁻¹) > muestreo 4 (1,21 mg L⁻¹) > muestreo 2 (0,59 mg L⁻¹). En la Figura IV.B.19 se muestran estos resultados, donde se observa un valor muy destacado para el punto de Puente Mayorga en el primer muestreo (el cual presentó la concentración de COD más elevada de 6,23 mg L⁻¹) y el punto de Isla Verde en el último muestreo (valor de COD de 2,51 mg L⁻¹). La legislación autonómica indica como valor imperativo del parámetro carbono orgánico total un nivel de 3 mg L⁻¹ para las aguas normales, que sólo es superado en el punto de Puente Mayorga. Las restantes muestras presentaron valores de COD similares a los encontrados en sistemas acuáticos próximos, como es el caso de la Bahía de Cádiz [Carrasco y col., 2003].

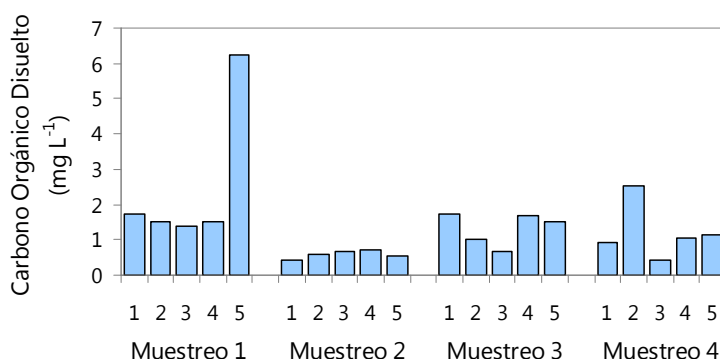


Figura IV.B.19. Contenido de carbono orgánico disuelto en las aguas estudiadas

➤ **Materia orgánica en sedimentos**

La materia orgánica presente en los sedimentos es un claro indicador de la calidad de los mismos. Tiene un papel fundamental en cuanto a retención de agua, cohesión del material que compone los sedimentos, resistencia a la erosión o retención de elementos, entre los que destacan aquellos que son contaminantes. Por tanto, la materia orgánica tiene una fuerte influencia en las propiedades físicas y químicas de los sedimentos, ya que tiende a interactuar con arcillas, iones metálicos, óxidos e hidróxidos para formar asociaciones solubles o insolubles, lo cual determinará la biodisponibilidad de metales y otros compuestos asociados a los sedimentos. Los procesos de consumo y degradación bióticos, que deben ser los principales procesos de movilización de la materia orgánica, no son a menudo lo suficientemente eficaces para mantener el equilibrio del ecosistema, debido al exceso de materia orgánica detrítica que provoca un aumento de las condiciones anóxicas y, a menudo, la

presencia de importantes niveles de contaminación por metales pesados y otros compuestos tóxicos [Misic y Harriagueç, 2009].

En la Figura IV.B.20 se encuentran representados los porcentajes de materia orgánica existentes en los sedimentos analizados. Se puede observar que dichos porcentajes fueron mayores en el primer y tercer muestreo, ambos correspondientes a la estación de otoño (tras la actividad biológica en los meses de verano), con valores medios de 13,6 y 8,4%, respectivamente. Los datos en los muestreos de primavera fueron inferiores, siendo los valores medios correspondientes al segundo y cuarto muestreo 2,6 y 4,0%, respectivamente. Además, se encontraron dentro del rango de valores normales para sedimentos de este tipo de ecosistemas [Carrasco y col., 2003; Vicente-Martorell y col., 2009].

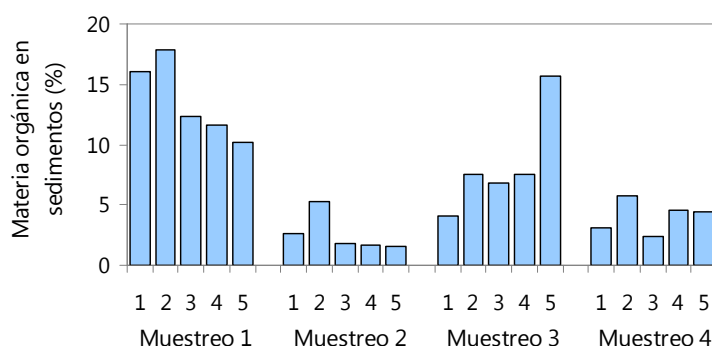


Figura IV.B.20. Porcentaje de materia orgánica en las muestras de sedimento estudiadas

Con objeto de definir mejor este ecosistema, se estudiaron las posibles correlaciones entre todos los parámetros físico-químicos estudiados. Para ello, una vez caracterizadas las distribuciones de estas variables como no paramétricas, se empleó la correlación de Spearman, obteniéndose correlaciones positivas y significativas ($p < 0,05$; $R_{\text{Spearman}} > 0,74$) para salinidad, sólidos disueltos totales y conductividad, poniendo de manifiesto el carácter salino del ecosistema. El oxígeno disuelto se correlacionó negativamente con la salinidad, sólidos disueltos totales y conductividad, ya que la presencia de sales y sólidos disueltos disminuye la solubilidad de un gas (APHA, llegando incluso a disminuir en más de una unidad el OD cuando se pasa de aguas dulces a agua de mar, y debido a que se reducen los espacios intermoleculares disponibles para la disolución del oxígeno. También correlacionó pero de forma negativa con la materia orgánica en sedimentos, debido a que la degradación de la materia orgánica consume oxígeno, por lo que estaría justificada esta correlación.

IV.B.5. Distribución y disponibilidad de Zn, Cd, Pb y Cu en la Bahía de Algeciras

En este apartado se detallan los niveles de Zn, Cd, Pb y Cu encontrados en aguas, sedimentos y tejidos de peces tomados en la Bahía de Algeciras. La evaluación de los resultados, tanto de los contenidos totales como de la especiación de cada uno de los metales en el medio, pretendía proporcionar una visión completa sobre la distribución de estos metales en los tres compartimentos fundamentales en el medio marino (agua, sedimento y peces), estudiar la potencial biodisponibilidad y peligrosidad respecto a la biota acuática y, además, evaluar las posibles influencias estacionales y espaciales que pudieran existir, mediante la realización de muestreos en diferentes épocas del año.

IV.B.5.1. Contenido metálico en aguas marinas

Como se ha indicado anteriormente, el aporte de metales pesados a los ecosistemas acuáticos puede tener un origen litogénico o geoquímico, como puede ser el arrastre por lluvias o erosión a partir de los minerales. Sin embargo, su principal origen es de tipo antropogénico, donde los mayores aportes proceden de industrias o vertidos de residuos, como consecuencia de la actividad humana. Generalmente, un metal disuelto en forma iónica es acumulado por la biota con mayor facilidad que en su forma elemental, presentando así un mayor efecto tóxico. Por tanto, los estudios de especiación metálica han adquirido una gran importancia, empleándose para la determinación de la fracción de metal más biodisponible, que será la que presente un mayor peligro para la biota. Cuando el metal accede a un organismo acuático tiende a concentrarse en ciertos tejidos, donde se bioacumula, pudiendo pasar a formar parte de la cadena trófica con posibles consecuencias, a largo plazo, sobre la salud humana.

IV.B.5.1.1. Contenido metálico total en aguas

El contenido metálico total de las aguas muestreadas en la Bahía de Algeciras fue analizado siguiendo la metodología descrita en el apartado IV.B.2.2. Los resultados obtenidos para los metales Zn, Cd, Pb y Cu pueden encontrarse en las Tablas A.5, A.6, A.7 y A.8 del Anexo 5.1.

Las concentraciones metálicas totales encontradas estuvieron dentro de los rangos o intervalos siguientes: Zn: 0,820-9,622 $\mu\text{g L}^{-1}$; Cd: <LD-0,096 $\mu\text{g L}^{-1}$; Pb: <LD-2,340 $\mu\text{g L}^{-1}$; Cu: <LD-1,605 $\mu\text{g L}^{-1}$. En la Figura IV.B.21 se representan los valores obtenidos en cada punto para cada campaña de muestreo. Los valores medios para cada metal (unificando todos los puntos y campañas de muestreo) fueron: Zn: $3,93 \pm 2,96 \mu\text{g L}^{-1}$;

Cd: $0,02 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$; Pb: $0,50 \pm 0,67 \mu\text{g L}^{-1}$; Cu: $0,24 \pm 0,43 \mu\text{g L}^{-1}$. Como puede concluirse de estos datos y puede observarse en las gráficas, la desviación estándar oscila de forma significativa en relación al valor medio a lo largo de los puntos y campañas de muestreo, en valores iguales a la media o incluso superiores. Las concentraciones metálicas medias siguen el siguiente orden $[\text{Zn}] > [\text{Pb}] > [\text{Cu}] > [\text{Cd}]$, siendo las concentraciones totales más bajas las correspondientes a los metales pesados Cd y Cu.

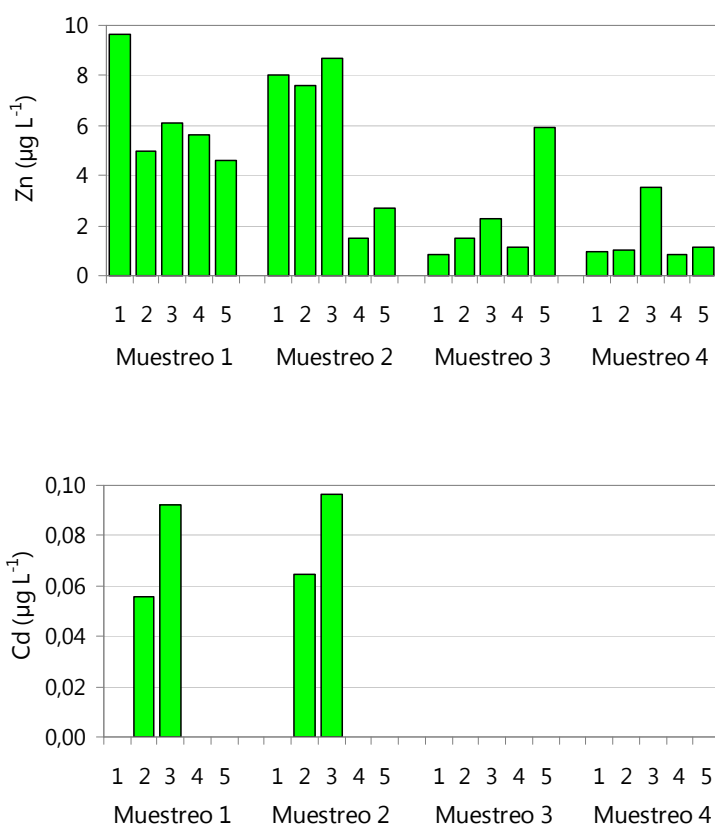


Figura IV.B.21. Concentración metálica total de Zn y Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$) en las cinco estaciones de muestreo de la Bahía de Algeciras

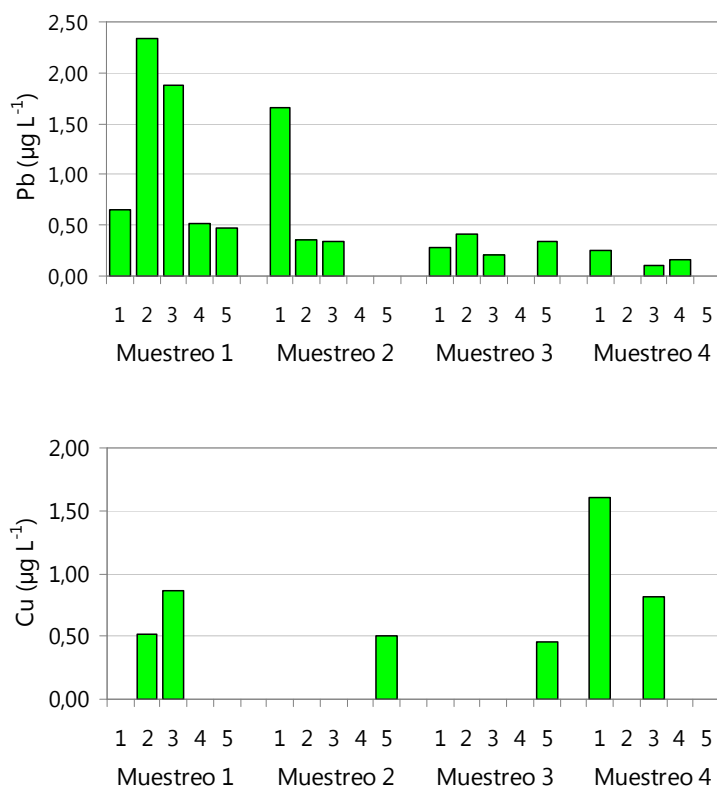


Figura IV.B.21 (cont.). Concentración metálica total de Pb y Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$) en las cinco estaciones de muestreo de la Bahía de Algeciras

- Los valores de concentración más altos se obtuvieron para el **Zn**. Los dos primeros muestreos mostraron valores más elevados que los dos últimos (valores medios de $6,193 \mu\text{g L}^{-1}$, $5,702 \mu\text{g L}^{-1}$, $2,273 \mu\text{g L}^{-1}$ y $1,493 \mu\text{g L}^{-1}$ para los muestreos 1, 2, 3 y 4, respectivamente). Por tanto, esta tendencia no pudo asociarse a cambios estacionales, aunque sí pudo ser debida a un foco puntual de contaminación en ese año, que con la elevada renovación de las aguas de la zona, produjo menores valores en los dos últimos muestreos. No obstante, estos valores fueron bajos en comparación con los usuales encontrados en sistemas costeros con tanto impacto antropogénico como la Bahía de Algeciras. Así, se realizó un estudio comparativo de estos valores con otros estudios previos realizados en la Ría de Huelva y en la Bahía de Cádiz, que son zonas próximas del litoral de Andalucía Occidental, durante los años 2004/2006. Los rangos de concentración para Zn fueron de $49,8-381,6 \mu\text{g L}^{-1}$ (valor medio de $167,2 \mu\text{g L}^{-1}$) para la ría y de $6,2-48,3 \mu\text{g L}^{-1}$ (valor medio de $21,0 \mu\text{g L}^{-1}$) para la bahía [Vicente-

Martorell, 2010]. Por tanto, los niveles de Zn fueron inferiores a los encontrados en estos dos ecosistemas próximos, detectándose, no obstante, algunos puntos con valores similares a los encontrados en la Bahía de Cádiz, que es una zona de baja contaminación en comparación con la Ría de Huelva, de gran impacto por metales pesados.

- El contenido metálico total en **Cd** fue el más bajo de los metales estudiados, no detectándose en la mayoría de las aguas analizadas, excepto para los puntos de Isla Verde y Palmones en el muestreo 1 y 2 ($LD_{Cd} = 0,013 \mu g L^{-1}$). Comparando estos resultados con los obtenidos en zonas próximas (indicadas en el párrafo anterior), cabe destacar que estos valores de Cd estaban por debajo de los hallados en la Ría de Huelva ($0,7-8,9 \mu g L^{-1}$), y eran bastante similares a los detectados en la Bahía de Cádiz, ($<LD_{Cd} = 0,45 \mu g L^{-1}$). Así pues, los resultados del presente trabajo se encontraron por debajo de los valores determinados en la Ría de Huelva y más acordes con los de la Bahía de Cádiz [Vicente-Martorell, 2010].

- El estudio de los niveles de **Pb** proporcionó resultados más significativos para los muestreos 1 y 2, al igual que ocurrió con Zn y Cd, encontrándose el contenido máximo en el punto de Isla Verde con $2,340 \mu g L^{-1}$ de Pb en el primer muestreo y en la Playa de Getares en el segundo muestreo. La tendencia de los resultados parece indicar un mayor efecto de posibles vertidos en esta zona más cercana al municipio de Algeciras, entre 2007 y 2008. En los dos últimos muestreos se encontraron concentraciones menores, incluso por debajo del límite de detección ($LD_{Pb} = 0,042 \mu g L^{-1}$) en algunos puntos. Del estudio comparativo con aguas cercanas de la costa andaluza se observó que las concentraciones totales de Pb en aguas de la Bahía de Algeciras resultaron más bajas que las encontradas en la Ría de Huelva ($2,6-17,8 \mu g L^{-1}$) y en la Bahía de Cádiz ($1,9-16,0 \mu g L^{-1}$), encontrándose escasos puntos con concentración semejante a la más baja registrada en ambos ecosistemas acuáticos [Vicente-Martorell, 2010].

- Los niveles de **Cu** encontrados fueron bastante heterogéneos para los diferentes puntos y muestreos, no detectándose valores apreciables en el punto 4 en ninguno de los muestreos realizados ($LD_{Cu} = 0,247 \mu g L^{-1}$). La presencia de estas concentraciones variables y tan bajas podría explicarse por la renovación de las aguas en la bahía debida a las corrientes del Estrecho, con focos de vertidos puntuales asociados a derrames o actividades marítimas. Destacan el punto 1 en el cuarto muestreo y el punto 3 en el primer y cuarto muestreo, derivados de la fábrica Acerinox en el punto de Palmones (punto 3) o del tráfico marítimo de la zona en la bocana de la bahía (punto 1). En relación con el Cu, los valores obtenidos en las aguas analizadas resultaron ser muy inferiores a los encontrados en la Ría de Huelva ($20,9$ y $72,4 \mu g L^{-1}$) y en la Bahía de Cádiz ($2,5-14,8 \mu g L^{-1}$), aunque los puntos con mayor contenido en Cu se

encontraron bastante cercanos al valor mínimo registrado en la Bahía de Cádiz [Vicente-Martorell, 2010].

Con objeto de analizar más la variabilidad de los resultados obtenidos, se estudió la influencia estacional y espacial de los niveles metálicos totales de Zn, Cd, Pb y Cu en agua aplicando el análisis de la varianza de Kruskal-Wallis y el test de comparación múltiple (test no paramétricos). En este estudio hay que considerar que muchos valores de concentración estuvieron por debajo del LD de la técnica, por lo que el estudio estadístico se asocia a una variabilidad de los parámetros muy desviada de una distribución normal. Así, se encontraron pocas diferencias significativas, destacando la existente entre los muestreos primero y último sólo para los valores de concentración de Zn ($p=0,0169$) y Pb ($p=0,0136$) en aguas. Los restantes metales y muestreos no mostraron diferencias con significación. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas para ningún metal entre los puntos de muestreo, existiendo solo influencia estacional para los valores de Pb, con valores mayores en otoño que en primavera.

De igual forma, se estudiaron las posibles correlaciones entre los contenidos metálicos totales de los metales mediante el test no paramétrico de Spearman, correlacionando de forma positiva la concentración de Zn con Cd ($R=0,5130$) y con Pb ($R=0,6624$), aunque éstas no fueron muy elevadas.

También se estudió si existía alguna relación entre los contenidos metálicos totales en las aguas y los parámetros físico-químicos del medio, encontrándose solo correlación significativa y destacada (R Spearman $>0,75$; $p<0,05$) entre el Pb y la conductividad, la salinidad y los TDS, lo que puede indicar en un origen geoquímico destacado. El comportamiento del resto de los metales no parecía estar influenciado por procesos asociados a estos parámetros, probablemente porque los niveles metálicos totales fueron muy bajos y estuvieron más afectados por las corrientes de la zona que los diluye, que por los aportes antropogénicos o geoquímicos, no pudiéndose establecer con claridad su origen en las aguas.

De lo descrito anteriormente, puede concluirse que las aguas estudiadas en la Bahía de Algeciras presentan concentraciones muy bajas de Zn, Cd, Pb y Cu, incluso comparadas con zonas no contaminadas ni industrializadas (como es el caso de la Bahía de Cádiz). Esto puede ser debido a que los aportes que recibe el ecosistema tienen bajas concentraciones de los metales pesados estudiados y/o a que las corrientes marinas del estrecho que afectan a esta zona, favorecen su dispersión, disminuyendo su concentración/contaminación.

IV.B.5.1.2. Especiación metálica en las aguas: distribución entre fase disuelta y particulada

Además del contenido metálico total, también se estudiaron en las aguas muestreadas el contenido metálico correspondiente a las fracciones disuelta y particulada, calculándose ésta última como la diferencia entre el contenido total y el disuelto. De esta forma, se tiene una primera aproximación sobre la distribución de los niveles de Zn, Cd, Pb y Cu en este compartimento. En la Figura IV.B.22 se muestran los porcentajes de distribución de los distintos metales entre las fases disuelta y particulada, siendo esta última la menos disponible para la biota acuática.

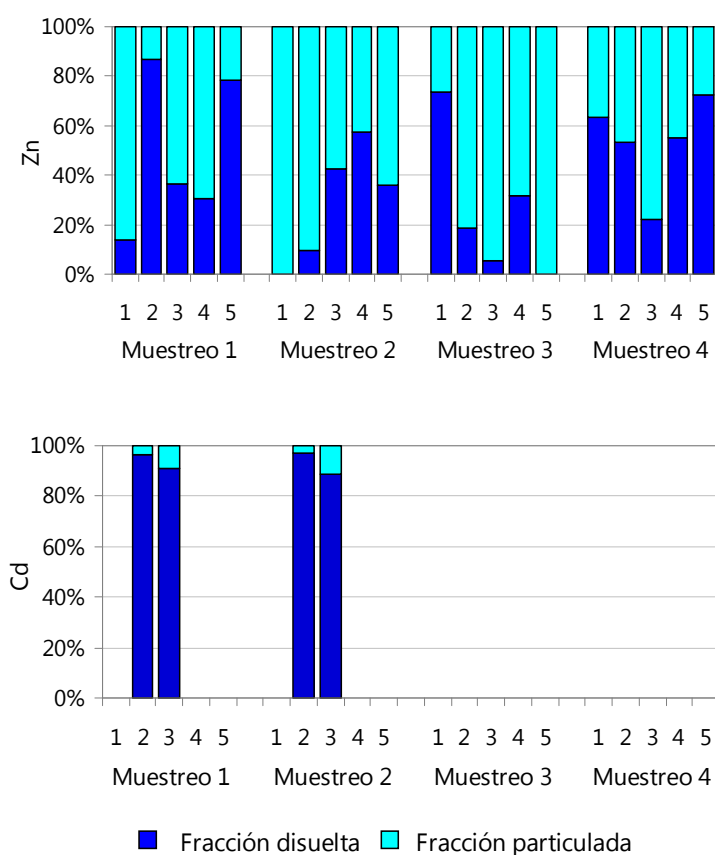


Figura IV.B.22. Distribución metálica (%) entre las fracciones disuelta y particulada para Zn y Cd en aguas

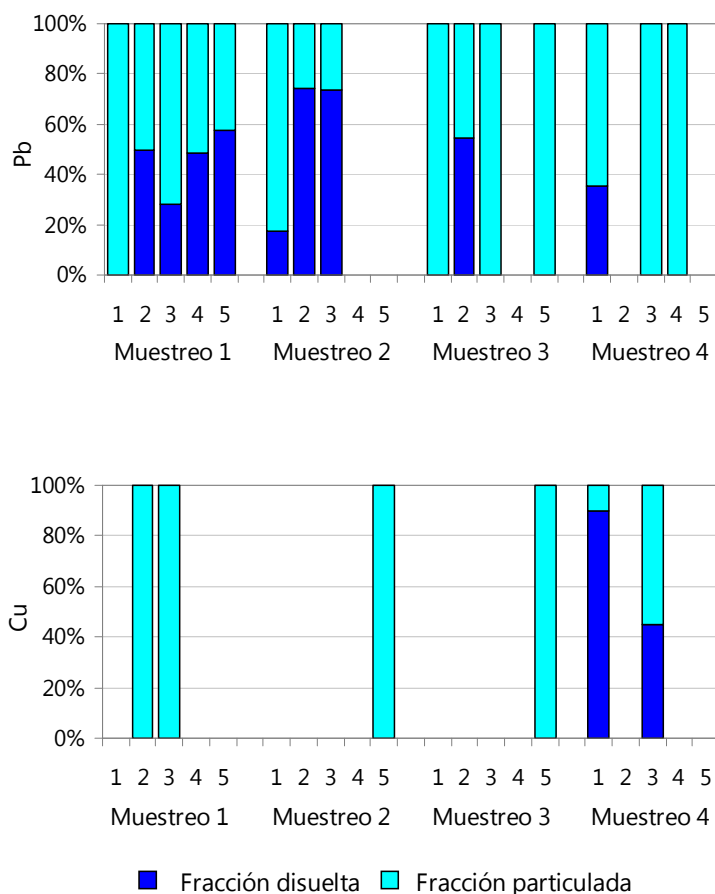


Figura IV.B.22 (cont.). Distribución metálica (%) entre las fracciones disuelta y particulada para Pb y Cu en aguas

En términos generales, se puede decir que los metales no siguieron una tendencia similar comparándolos entre sí y comparando puntos de muestreo y muestreos. Destaca el Cd, que se encontró principalmente en forma disuelta. Zn, Cu y Pb se distribuyeron en una u otra fracción en función del muestreo. Así, el Pb se concentró en la fase particulada en los últimos muestreos mientras que en el primero y el segundo la distribución fue más homogénea entre ambas fases. El Cu en la fase particulada fue más destacado en los tres primeros muestreos, pasando a enriquecerse la fase disuelta en el último muestreo de primavera. En el caso del Zn la fase particulada fue ligeramente más significativa en el muestreo tercero. Además, cabe

destacar que en algunos puntos la fracción particulada fue muy significativa coincidiendo con aquellos puntos donde el nivel total de metal fue mayor (Zn: P1-muestreo 1; P1, P2, P3-muestreo 2; P5-muestreo 3; P3-muestreo 4; Pb: P1-muestreo 2; Cu: P2, P3-muestreo 1. No obstante, se dieron algunas excepciones para Pb en P1-muestreo 1 y Cu en P1-muestreo 4, donde la fracción disuelta fue mayor.

- En el caso del **Zn**, la mayoría de los puntos mostraron un mayor contenido metálico en forma particulada, siendo éste del 100% en la Playa de Getares en el muestreo 2. En el primer muestreo este metal también mostró una fracción particulada elevada (85,9%) en ese punto, sin embargo, para los muestreos 3 y 4, la tendencia fue inversa (mayor contenido de Zn en forma disuelta). Otras excepciones pueden observarse en los puntos 2 y 5 (Isla Verde y Puente Mayorga) en los muestreos 1 y 4, y el punto 4 (Guadarranque) en los muestreos 2 y 4, todos ellos con un porcentaje mayoritario en forma disuelta.

- Respecto al **Cd**, la mayoría de los puntos mostraron concentraciones no detectables tras ser analizados por voltamperometría de redisolución anódica. Únicamente se obtuvieron ciertos contenidos para los puntos de Isla Verde y Palmones en el primer y segundo muestreo, encontrándose casi todo el contenido metálico en forma disuelta (>88% en todos los casos). Se puede concluir que debido a sus bajas concentraciones y a pesar del hecho de encontrarse mayoritariamente en forma disuelta, no se estima que este metal entrañe un peligro preocupante para la biota acuática.

- Para el **Pb**, destacar que se encontró mayoritariamente en forma particulada en la Playa de Getares en todos los muestreos, así como en los puntos 3 y 5 en el muestreo 3, y los puntos 3 y 4 en el muestreo 4. Para Puente Mayorga no se detectó concentración de Pb en los muestreos 2 y 4, así como para Guadarranque en los muestreos 2 y 3 e Isla Verde en el muestreo 4. Para el resto de los puntos, los porcentajes entre ambas fracciones se reparten de forma más homogénea durante los dos primeros muestreos, destacando los altos porcentajes de fracción disuelta en Isla Verde y Palmones en el segundo muestreo (con porcentajes del 74,5% y 73,5%, respectivamente).

- En cuanto a la distribución del **Cu**, en aquellos puntos en los que se detectaron niveles medibles de metal, la mayoría presentó un mayor porcentaje de metal particulado con respecto al contenido total en los tres primeros muestreos. En la Playa de Getares, se encontró Cu medible solamente en el último muestreo, correspondiendo en su mayor parte (89,9%) a la fase disuelta. En este mismo muestreo, se encontró que en el punto de Palmones el contenido estaba repartido entre la fase disuelta y particulada.

En relación al porcentaje de metal en la fracción disuelta (en los puntos en los que pudo ser analizado), los metales pueden ordenarse de mayor a menor, con el siguiente orden: $Cd > Zn > Pb > Cu$, donde sus porcentajes medios en la fase disuelta respecto del total fueron: 93,3%, 39,4%, 29,2% y 22,5%, respectivamente. Esto proporciona información acerca de la mayor biodisponibilidad del cadmio frente a la menor predisposición del resto de metales para ser asimilados por ciertos organismos acuáticos, aunque debido a tener la menor concentración el efecto del cadmio podría no ser significativo.

La relación o proporción entre la fase particulada y la disuelta se suele describir mediante el denominado coeficiente de reparto K_d , definido como la relación existente entre la concentración de un metal en la fase particulada (en unidades de $mg\ kg^{-1}$) y su concentración en la fase disuelta (expresada en $mg\ L^{-1}$), es decir, $K_d\ (L\ kg^{-1}) = [M_{particulado}]/[M_{disuelto}]$.

Así, es posible conocer la razón entre el contenido metálico presente en la materia particulada y el metal disuelto en las aguas estudiadas. Para el Zn, los coeficientes de reparto que pudieron ser calculados, varían ampliamente entre 6.368-778.649 $L\ kg^{-1}$; para Cd, sólo pudieron calcularse en los dos puntos detectados en los muestreos 1 y 2, con valores entre 1.536-8.102; para Pb, 18.247-335.239; y para Cu, sólo se obtuvieron valores para dos puntos 5.327-53.838 (Tabla IV.B.19). Además, cabe destacar que Pb y Cu estuvieron presentes únicamente como fase particulada en muchas muestras, por lo que el valor de K_d era infinito, y no cuantificable. En las muestras donde el valor de K_d fue muy elevado es previsible encontrar una mayor afinidad del metal por la fase sólida.

Tabla IV.B.19. Coeficientes de reparto K_d ($L\ kg^{-1}$) de Zn, Cd, Pb y Cu entre la materia suspendida y la fase disuelta en las aguas de la Bahía de Algeciras

Muestreo	Estación de muestreo	Coeficiente de reparto K_d ($L\ kg^{-1}$) ^a			
		Zn	Cd	Pb	Cu
1	1	229.455	<L.D.	Particulado	<L.D.
	2	6.368	1.536	42.385	Particulado
	3	71.013	3.938	105.448	Particulado
	4	72.383	<L.D.	33.830	<L.D.
	5	6.696	<L.D.	18.274	<L.D.
2	1	Particulado	<L.D.	335.239	<L.D.
	2	617.320	2.144	23.167	<L.D.
	3	85.614	8.102	22.603	<L.D.
	4	50.598	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	5	110.605	<L.D.	<L.D.	Particulado
3	1	12.247	<L.D.	Particulado	<L.D.
	2	255.688	<L.D.	48.330	<L.D.
	3	778.649	<L.D.	Particulado	<L.D.
	4	92.460	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	5	Particulado	<L.D.	Particulado	Particulado
4	1	27.225	<L.D.	86.320	5.327
	2	39.802	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	3	154.337	<L.D.	Particulado	53.838
	4	37.611	<L.D.	Particulado	<L.D.
	5	18.866	<L.D.	<L.D.	<L.D.

^a <L.D.: Concentraciones totales por debajo del límite de detección

PARTICULADO: Todo el metal detectado se encuentra en la fase particulada

Comparando los resultados obtenidos con los encontrados en estudios similares para otros ecosistemas estuáricos y bahías de elevada salinidad (del orden de $30\ g\ L^{-1}$), recogidos en la Tabla IV.B.20, los rangos obtenidos en este estudio fueron similares, indicando un comportamiento acorde con zonas de estuario/bahías con efectos antropogénicos y geoquímicos [Chiffolleau y col., 1994; Balls y col., 1994; Comber y col., 1995; Zwolsman y van Eck, 1999; Tang y col., 2002; Hatje y col., 2003; Wang y Liu, 2003; Koshikawa y col., 2007; Vicente-Martorell, 2010; Takata y col., 2012].

Tabla IV.B.20. Comparación de valores de Log K_d ($L\ kg^{-1}$) de varios estuarios y bahías encontrados en la bibliografía con los obtenidos en la Bahía de Algeciras

Ecosistema acuático	Log K_d ($L\ kg^{-1}$)				Referencias
	Zn	Cd	Pb	Cu	
Estuario del Sena (Francia)	4,4-4,7	3,9-4,0	6,1-6,3	4,5-4,7	Chiffolleau y col., 1994
Estuario de Forth (UK)	4,5-5,4	3,8-5,9	5,3-6,5	4,4-4,9	Balls y col., 1994
Estuario Humber (UK)	3,34	3,30		3,90	Comber y col., 1995
Estuario Mersey (UK)	4,48	4,40	5,45	5,00	Comber y col., 1995
Estuario de Scheldt (Países Bajos)	4,48-5,16	4,34-5,14		4,49-4,64	Zwolsman y col., 1999
Bahía de Galveston (EEUU)	3,2-5,2	4,0-5,0	4,6-6,6	2,9-4,2	Tang y col., 2002
Estuario del Puerto Jackson (Australia)	4,7-5,2			3,9-5,1	Hatje y col., 2003
Estuario Changjiang (China)	4,54-5,43	3,19-4,85	4,42-5,40	4,17-5,09	Wang y Liu, 2003
Estuario Yangtze (China)		3,7-3,9		4,6-4,8	Koshikawa y col., 2007
Ría de Huelva (España)	3,23-4,57	3,15-4,73	3,98-5,09	4,15-5,04	Vicente-Martorell, 2010
Bahía de Cádiz (España)	2,3-4,5	3,3-4,6	2,6-5,2	3,5-4,9	Vicente-Martorell, 2010
Bahía de Sagami (Japón)		4,2-5,9		3,8-6,2	Takata y col., 2012
Bahía de Algeciras (España)	3,80-5,89	3,19-3,91	4,26-5,53	3,73-4,73	Este estudio

Con objeto de correlacionar gráficamente el coeficiente de reparto con el contenido en materia particulada en las aguas se representó el logaritmo decimal del coeficiente de reparto (Log K_d) frente a los sólidos en suspensión. Sólo se realizó para el Zn y Pb, por disponerse de escasos valores para Cd, y Cu. En la Figura IV.B.23 puede observarse que los valores de K_d no variaron significativamente con los sólidos en suspensión (SS), aunque se detectó una pequeña disminución del metal particulado con los SS más destacada para el Zn que para el Pb.

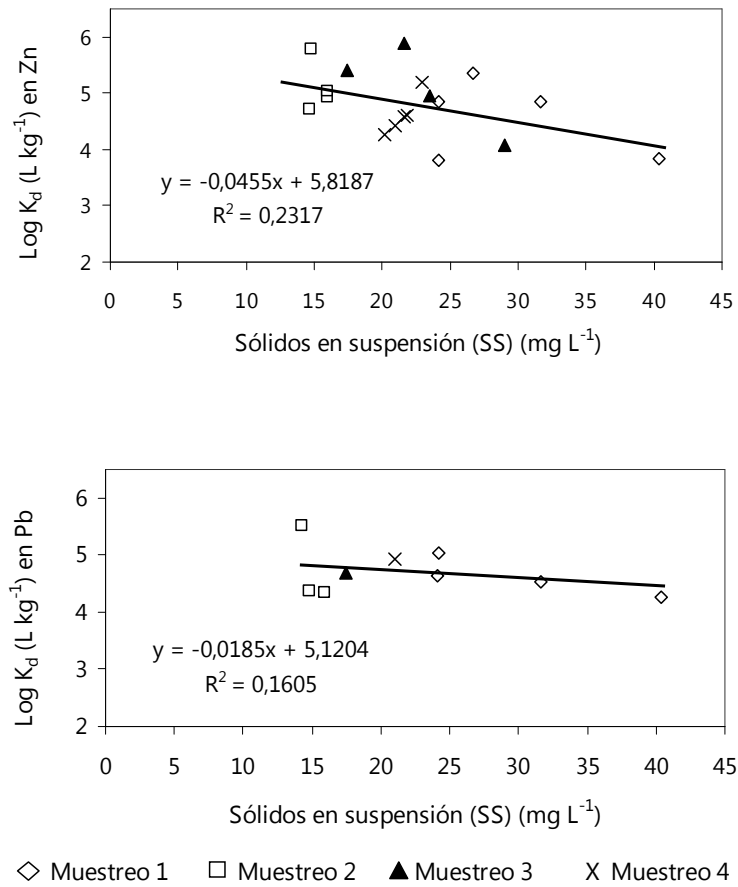


Figura IV.B.23. Correlación entre los coeficientes de reparto de Zn y Pb (expresados como Log K_d (L kg⁻¹)) y los sólidos en suspensión para cada muestreo

Con objeto de conocer las tendencias estacionales o espaciales de las concentraciones metálicas en las fases disuelta y particulada de estas muestras, se realizaron los estudios correspondientes del análisis de la varianza sobre estas concentraciones. Para ello, se utilizó el test de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrico) dado que los datos no presentaron una distribución normal. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre los puntos de muestreo tanto para el contenido de metal en la fase disuelta como en la particulada. Solo se encontraron diferencias significativas para la concentración de Zn en la fase disuelta entre los muestreos 1 y 3 ($p = 0,007$). También se estudió la posible influencia estacional en las

fracciones metálicas disuelta y particulada, encontrándose diferencias entre las muestras de otoño y primavera solo para el contenido de Pb particulado.

Igualmente se obtuvieron las correlaciones entre las fracciones disuelta/particulada de los metales, mediante el test no paramétrico de Spearman. Solo se observó que la fracción disuelta de Cd correlacionaba con la de Zn ($R=0,5207$) y Pb ($R=0,6181$), ambos en fase disuelta. No obstante, los coeficientes de correlaciones no fueron muy elevados.

Dado que las concentraciones encontradas en los estudios sobre la fracción disuelta de las aguas fueron más pequeñas de lo esperado, resultando incluso no detectables para Cd y Cu en la mayoría de los casos, no se prosiguió con el estudio de la especiación. Este estudio hubiera permitido conocer la fracción disuelta orgánica/inorgánica según su comportamiento lábil, poco lábil y no lábil (cuyos procedimientos fueron descritos y detallados en la Figura IV.B.6), pero al ser el contenido disuelto tan pequeño o no detectable, no se hubieran podido detectar tampoco las fracciones de este contenido.

Los resultados descritos en este apartado para las fracciones disuelta y particulada de los metales Zn, Cd, Pb y Cu en las aguas de la Bahía de Algeciras, se encuentran detallados en las tablas del Anexo 5.1.

IV.B.5.2. Contenido metálico en sedimentos marinos

Los sedimentos marinos constituyen el depósito final de las sustancias que se encuentran formando parte de las aguas más superficiales de un ecosistema acuático. Estas sustancias pueden generarse en el propio medio (como consecuencia de procesos biológicos), o bien ser introducidas mediante procesos naturales y/o antrópicos. Las actividades industriales en la zona costera estudiada implicarían una entrada continua de contaminantes al medio, parte de los cuales se depositarían finalmente entrando en contacto con los sedimentos marinos causando efectos negativos sobre los mismos y sobre su entorno.

Es por ello, que el conocimiento de las propiedades y composición de los sedimentos es de suma importancia y permite evaluar los estados de los ambientes marinos y su influencia sobre la salud del ecosistema [Yang y col., 2012].

Los metales pesados se encuentran asociados a las distintas fases de los sedimentos, por lo que la determinación del contenido total no es suficiente para evaluar el estado o posible impacto medioambiental de este compartimento. Por

ejemplo, la asimilación de esos metales por parte de organismos bentónicos depende fuertemente de su movilidad, concentración total y formas químicas, por lo que un estudio de especiación en los mismos resulta indispensable [Morillo y col., 2007]. Así, determinadas formas químicas en las que se encuentran los metales pueden no ser asimiladas por la biota, no entrañando en este caso riesgo alguno. Al igual que en las aguas, el comportamiento de los metales en los sedimentos depende de su forma química, la cual influirá sobre su toxicidad, movilidad y biodisponibilidad.

IV.B.5.2.1. Contenido metálico total en sedimentos

Los contenidos metálicos totales de los sedimentos muestreados en la Bahía de Algeciras fueron analizados mediante ICP-MS después de ser tratados según se indica en el apartado de metodología IV.B.2.3.1. Los resultados obtenidos se han representado en la Figura IV.B.24. Los valores de concentración totales para los metales estudiados se encuentran dentro de los siguientes intervalos: Zn: 27,49-103,23 mg kg⁻¹; Cd: <LD-0,37 mg kg⁻¹; Pb: 9,68-30,44 mg kg⁻¹ y Cu: 4,32-29,22 mg kg⁻¹, siendo el contenido medio: 52,61±19,28 mg kg⁻¹ para Zn; 0,15±0,13 mg kg⁻¹ para Cd; 21,38±5,10 mg kg⁻¹ para Pb; y 16,63±6,96 mg kg⁻¹ para Cu. En base a estos valores medios existentes en la bahía, es posible ordenar la concentración de mayor a menor contenido metálico: [Zn] > [Pb] > [Cu] > [Cd]. Este orden en sedimentos es similar al obtenido anteriormente para el contenido metálico total en aguas.

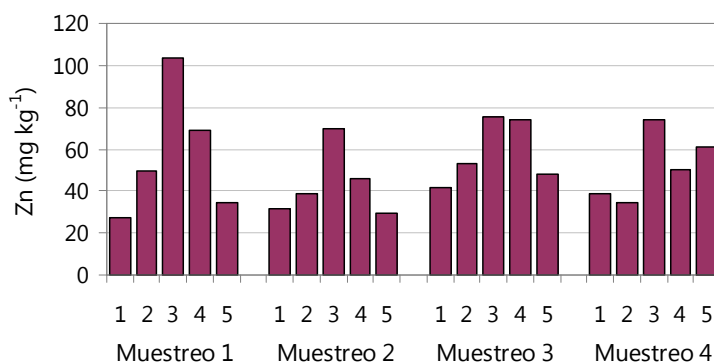


Figura IV.B.24. Concentración metálica total de Zn (mg kg⁻¹) en sedimentos de las cinco estaciones de muestreo de la Bahía de Algeciras

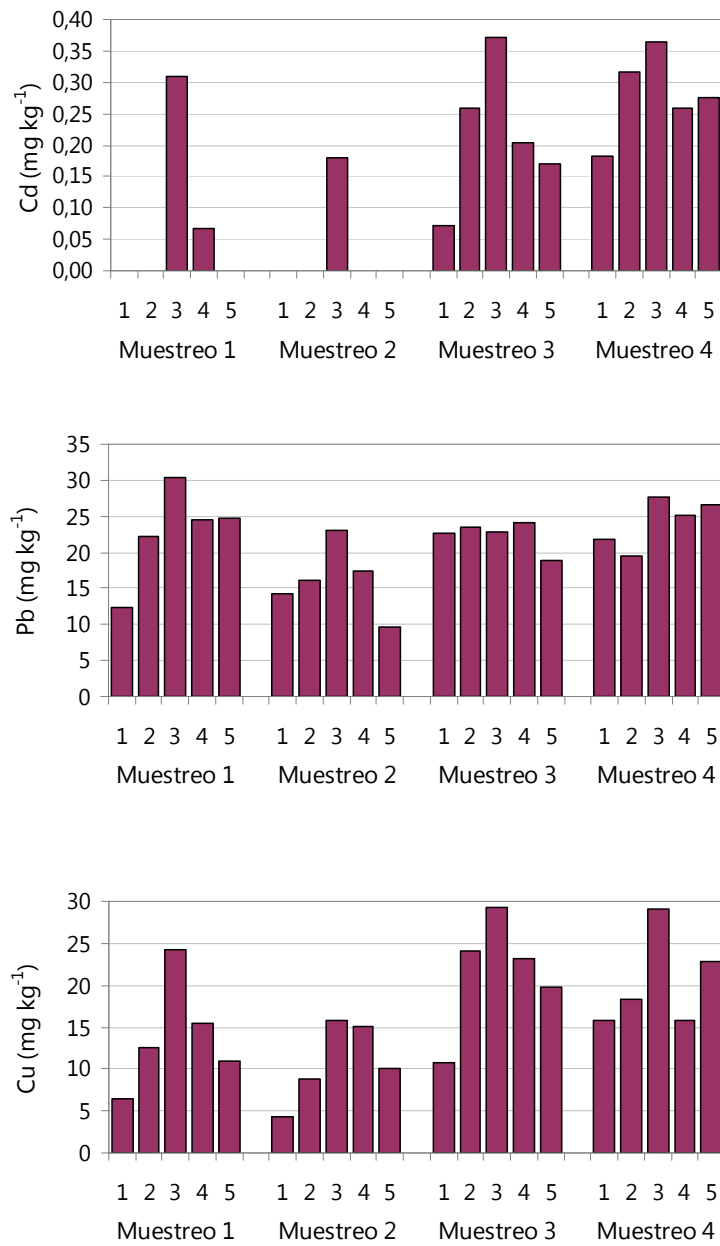


Figura IV.B.24 (cont.). Concentración total de Cd, Pb y Cu (mg kg⁻¹) en sedimentos de las cinco estaciones de muestreo de la Bahía de Algeciras

A partir de los resultados se puede observar claramente que el punto P3 correspondiente a Palmones fue el que presentó una mayor concentración para todos los metales en los sedimentos. La cercanía de la empresa Acerinox, así como de la central térmica, puede ser el origen principal de estos metales en las muestras analizadas. El Zn y el Cu son metales frecuentes en industrias de aceros inoxidables. El primero se usa como revestimiento aplicado sobre la superficie de este tipo de aceros, mientras que el Cu es un elemento adicionado en el proceso de fabricación de estos aceros para hacerlos más resistentes a la corrosión. Igualmente, el cadmio y el plomo son metales pesados que pueden ser emitidos por las centrales térmicas que existen en la zona. No obstante, son el níquel y el cromo los metales mayoritarios en este tipo de industrias. Estos metales fueron determinados en un estudio paralelo en el grupo de investigación, encontrándose las concentraciones máximas en Palmones, con valores medios muy significativos de $141,33 \text{ mg kg}^{-1}$ para Ni y $316,52 \text{ mg kg}^{-1}$ para Cr [Díaz de Alba, 2013]. Los valores medios de concentración total correspondientes a los metales de este estudio en el punto de Palmones fueron: Zn: $80,66 \text{ mg kg}^{-1}$; Cd: $0,31 \text{ mg kg}^{-1}$; Pb: $26,01 \text{ mg kg}^{-1}$; Cu: $24,58 \text{ mg kg}^{-1}$.

Respecto a la variación de los niveles metálicos en los distintos puntos a lo largo de todos los muestreos realizados, se pueden hacer las siguientes observaciones:

- En el caso del **Zn**, las concentraciones obtenidas presentaron la misma tendencia en los dos primeros muestreos, con valores máximos en el punto de Palmones (muestreo 1: $103,23 \text{ mg kg}^{-1}$; muestreo 2: $69,75 \text{ mg kg}^{-1}$) y una disminución de las concentraciones al alejarse de este punto. En el tercer muestreo, este valor elevado del punto P3 (Palmones) también se detectó en el P4 (Guadarranque), y en el cuarto muestreo se dio junto con el P5 (Puente Mayorga).

- Las concentraciones de **Cd** en sedimentos fueron bajas (inferiores a $0,40 \text{ mg kg}^{-1}$) en comparación con el resto de metales evaluados, y únicamente detectables en los puntos de Palmones (P3) y Guadarranque (P4) en el primer muestreo y en P3 para el segundo muestreo. Para el tercer y cuarto muestreo se obtuvieron concentraciones ligeramente más significativas y fueron detectadas en todos los puntos estudiados, siendo de nuevo el punto P3 el de mayor concentración.

- Para el **Pb**, las concentraciones se mantuvieron bastante similares entre puntos y entre campañas de muestreos, aunque al igual que para Zn, los valores mayores se obtuvieron para los sedimentos del P3 con una disminución al alejarse de esta zona, sobre todo en los muestreos 1 y 2. Esta disminución no fue tan acusada en el muestreo 3 (donde las concentraciones permanecieron prácticamente invariables en todos los puntos de muestreo), ni tampoco en el muestreo 4, exceptuando los puntos P1 y P2.

- En cuanto al **Cu**, la tendencia fue semejante a la de Zn, volviéndose a obtener los valores más altos en la estación de Palmones P3, siendo más destacados en los dos últimos muestreos (próximos a 30 mg kg^{-1}). El resto de los puntos de muestreo aumentaron también en los muestreos 3 y 4. El punto P5 correspondiente a Puente Mayorga presentó en el último muestreo un valor de concentración total en sedimentos mayor que el observado en Guadarranque P4 (al contrario que en los otros muestreos).

De forma semejante a lo realizado en las aguas, se estudiaron las posibles influencias espaciales y estacionales que podían presentar los metales estudiados en las muestras de sedimento. Primero se estudiaron los análisis de la varianza de Kruskal-Wallis y los test de comparación múltiple correspondientes (test no paramétricos) para comparar resultados entre muestreos, observándose diferencias significativas para los valores de Cd entre los muestreos 2 y 4 ($p=0,0122$). Por otro lado, aplicado este análisis a las variaciones entre puntos de muestreo se detectaron diferencias significativas para Zn y Cu entre los puntos de muestreo P1 (Playa de Getares) y P3 (Palmones). En cambio, no se obtuvo diferencias significativas entre estaciones (primavera-otoño) para ninguno de los metales, ya que los valores de p fueron superiores al valor de 0,05. Pudo concluirse que el comportamiento espacial y estacional no fue comparable entre aguas y sedimentos, siendo las concentraciones en aguas más variables entre muestreos/estaciones (para Zn y Pb) mientras que en sedimentos destacaba más la variabilidad entre puntos (para Zn y Cu entre P1 y P3).

Las correlaciones de Pearson más significativas en sedimentos se encontraron entre los metales Zn y Pb ($R=0,7474$), Zn y Cu ($R=0,8135$) y Cd y Cu ($R=0,8881$). Se estudió, además, si existía relación entre el contenido metálico total en sedimentos y los parámetros físico-químicos, encontrándose que ninguno de los metales estaba especialmente relacionado con estos parámetros. Tampoco se obtuvieron correlaciones significativas entre los contenidos metálicos totales en aguas y en sedimentos.

A continuación se comparan los valores totales de Zn, Cd, Pb y Cu encontrados en los sedimentos de la Bahía de Algeciras con los de sedimentos procedentes de otros ecosistemas acuáticos. Además, se incluyen otros estudios realizados en la propia bahía. En base a todos estos resultados (pertenecientes a bibliografía científica relativamente reciente), se puede confirmar que:

- Comparando los valores de Zn encontrados en los sedimentos de la Bahía de Algeciras ($27,49\text{-}103,23 \text{ mg kg}^{-1}$) con sedimentos analizados en la Bahía de Cádiz ($29,96\text{-}88,51 \text{ mg kg}^{-1}$), resultaron bastante similares. En cambio, son mucho menores que los encontrados en muestras procedentes de la Ría de Huelva (área considerada como uno de los estuarios más contaminados por metales pesados), los cuales se

encontraron entre 602,94 y 1.736,9 mg kg⁻¹ [Vicente Martorell, 2010]. En el Puerto de Barcelona los valores variaron dentro del rango 183-308 mg kg⁻¹, algo superiores a los de este estudio [Guevara-Riba y col., 2004]. En el área del Golfo de Thermaikos y en la Bahía de Thessaloniki en Grecia (zona industrializada que además recibe residuos urbanos de las ciudades adyacentes), se han descrito valores que oscilan en el intervalo 74-358 mg kg⁻¹, similares a los de Barcelona y al valor máximo de la Bahía de Algeciras [Christophoridis y col., 2009]. Otro estudio interesante es el análisis en los sedimentos de la costa de Galicia, cuyas aguas se vieron afectadas por un serio vertido puntual de fuel en 2002, debido al accidente del buque "Prestige". Estudios sobre el fuel transportado indicaron la presencia de metales pesados como Zn, Cd, Pb y Cu, por lo que se analizaron estos niveles en los sedimentos unos años más tarde. Los niveles encontrados, 14-114 mg kg⁻¹, fueron del orden a los existentes en la Bahía de Algeciras, poniéndose de manifiesto que una contaminación de tipo crónico puede entrañar un mayor riesgo que una contaminación puntual o aguda. En este mismo artículo, analizaron también la bahía objeto del presente estudio, estando el intervalo de concentración entre los valores 23,0-138 mg kg⁻¹, intervalo que resulta muy acorde con los encontrados en este trabajo [Morales-Caselles y col., 2007]. Además, los presentes resultados experimentales sobre los sedimentos de la Bahía de Algeciras pueden ser comparados también con otro estudio, realizado en la misma zona por Morillo y col., donde el Zn osciló entre 18-95 mg kg⁻¹, valores que también presentan una gran similitud con los anteriores así como con los mostrados en la presente Tesis [Morillo y col., 2007].

- Los valores de concentración de Cd (<LD-0,37 mg kg⁻¹) son del mismo orden que los encontrados en la Bahía de Cádiz, los cuales oscilan dentro del intervalo 0,06-0,22 mg kg⁻¹; pero se encuentran muy por debajo de los registrados en el estuario contaminado de la Ría de Huelva (1,5-33,2 mg kg⁻¹) [Vicente Martorell, 2010]. También son moderadamente inferiores a los registrados en el Puerto de Barcelona, los cuales variaron entre 0,43-1,43 mg kg⁻¹ [Guevarra-Riba y col., 2004]. En las costas de Galicia, los sedimentos no mostraron valores detectables para este metal en los sedimentos estudiados, por lo que los sedimentos del presente estudio muestran una mayor contaminación de Cd que la zona afectada por el accidente del petrolero. Estos autores compararon estos valores con otros obtenidos también en la Bahía de Algeciras, estando los valores entre 0,11-0,61 mg kg⁻¹, y por tanto, fueron del mismo orden que los datos obtenidos en la presente Tesis [Morales-Caselles y col., 2007]. Morillo y col., fueron otros de los autores que analizaron este metal en sedimentos en la Bahía de Algeciras, estando estos valores algo por encima de los determinados en este trabajo (0,53-0,84 mg kg⁻¹) [Morillo y col., 2007].

- Los valores de Pb obtenidos en este estudio se encontraron dentro del intervalo 9,68-30,44 mg kg⁻¹, los cuales son prácticamente iguales que los encontrados en la Bahía de Cádiz (6,69-26,31 mg kg⁻¹). Por el contrario, los registrados para otro ecosistema andaluz como es la Ría de Huelva oscilaban en un amplio rango entre 136,8-1.166,7 mg kg⁻¹, siendo estos últimos mucho mayores que los de la Bahía de Algeciras [Vicente Martorell, 2010]. Estudios realizados en la Bahía de Barcelona proporcionaron valores (86,3-130 mg kg⁻¹) algo superiores a los del área objeto de este estudio [Guevarra-Riba y col., 2004]. En Grecia, en el Golfo de Thermaikos y la Bahía de Thessaloniki, los valores oscilaron entre 10 y 218 mg kg⁻¹, estando los presentes valores dentro de este intervalo, aunque el máximo es superior al obtenido en la Bahía de Algeciras [Christophoridis y col., 2009]. Los estudios llevados a cabo en los sedimentos de la Costa de Galicia, afectada por el accidente del "Prestige", mostraron valores de Pb entre 4,1 y 31,0 mg kg⁻¹, similares a los reportados en esta Tesis. Estos autores encontraron valores entre 6,2 y 32,0 mg kg⁻¹ en la Bahía de Algeciras, idénticos a los del presente estudio y a los correspondientes a la costa de Galicia. Estos resultados vuelven a poner de manifiesto la contaminación crónica en esta zona industrial de la Bahía de Algeciras, de igual magnitud que la detectada en las aguas contaminadas de Galicia [Morales-Caselles y col., 2007]. Asimismo, Morillo y col. concluían tras el análisis de sedimentos procedentes de la Bahía de Algeciras, que los niveles totales de Pb se encontraban en el intervalo 9,1-33,0 mg kg⁻¹, resultados que de nuevo están conformes con el presente trabajo [Morillo y col., 2007].

- Los valores obtenidos en el caso del Cu (con un valor mínimo-máximo de: 4,32-29,22 mg kg⁻¹), se encontraron por debajo de los determinados en los sedimentos de la Bahía de Cádiz (cuyo intervalo fue 31,85-79,65 mg kg⁻¹); siendo, por otra parte, mucho más elevados los analizados en la contaminada Ría de Huelva (1.115,7-3.333,6 mg kg⁻¹) [Vicente Martorell, 2010]. También fueron más bajos que los detectados en el Puerto de Barcelona (70,7-194,0 mg kg⁻¹) [Guevarra-Riba y col., 2004]. En el Golfo de Thermaikos y la Bahía de Thessaloniki (Grecia) los valores para este metal oscilaron entre los 19 y 165 mg kg⁻¹, donde algunos de los puntos estudiados (los más alejados de las fuentes de contaminación) presentaron concentraciones similares a las de otros puntos en Algeciras [Christophoridis y col., 2009]. Del mismo modo, algunos puntos de la Bahía de Algeciras mostraron valores similares a los encontrados en determinadas zonas de la Costa de Galicia (16,2-251,0 mg kg⁻¹), aunque los sedimentos presentaron concentraciones más altas en las aguas gallegas. La Bahía de Algeciras, según estos mismos autores, osciló entre 3,67-30,5 mg kg⁻¹ de Cu en sedimentos, datos equivalentes a los presentes [Morales-Caselles y col., 2007]. Los estudios realizados por Morillo y col., registraron concentraciones metálicas totales entre 6,7-42,0 mg kg⁻¹, similares a los detectados tras el análisis de los sedimentos muestreados para el presente estudio [Morillo y col., 2007].

IV.B.5.2.2. Especiación metálica en sedimentos

Como ya se ha comentado anteriormente, se hace necesario realizar estudios acerca de la especiación metálica en sedimentos para poder determinar las diversas formas químicas en las que se encuentran los metales, así como el tipo de sustrato al que se hallan ligados o asociados los cationes metálicos, con el objetivo final de estimar la posible removilización de dichos metales desde este compartimento a la columna de agua al producirse cambios en las condiciones ambientales del ecosistema en el que se encuentran. Así, las diferentes formas químicas que presenten los metales en los sedimentos (fácilmente intercambiables, asociadas a carbonatos, óxidos, sulfuros, compuestos organometálicos, iones en redes cristalinas o minerales, etc.), determinarán su capacidad de movilización y biodisponibilidad. Para realizar especiación metálica en sedimentos se conocen varios métodos los cuales se pueden encontrar en la literatura científica, pero es sin duda el método basado en el procedimiento de extracción secuencial el más ampliamente usado, el cual se basa en el empleo secuencial de varios disolventes, gracias a lo cual se logra la obtención de distintas fases [Morillo y col., 2004].

Por tanto, el esquema de especiación aplicado fue el propuesto en 1992 por la *Community Bureau of Reference* (BCR) de la Comisión de las Comunidades Europeas, la cual estableció la utilización y forma de aplicación de diversos extractantes, con el fin de armonizar las diferentes técnicas empleadas en análisis de metales pesados en suelos y sedimentos. Este procedimiento de extracción química sucesiva permite la obtención final de tres fases: la **fase intercambiable** (constituida por iones fácilmente intercambiables, solubles en agua y ácidos débiles, y por especies asociadas a carbonatos), la cual contiene las formas químicas que pueden ser más fácilmente liberadas tras pequeños cambios en el medio; la **fase reducible** (especies asociadas a óxidos de hierro o manganeso) y la **fase oxidable** (especies metálicas asociadas a materia orgánica y/o sulfhídrica). El residuo sólido remanente contiene la fracción considerada como no reactiva, ya que la liberación de especies contenidas en esta fase se considera prácticamente improbable. Esta fase también fue analizada y se definió como **fase residual**, la cuarta fase recogida tras este estudio de especiación secuencial. De esta forma, las especies extraídas en la primera fase de la especiación constituyen la fracción más lábil del sedimento, a la cual les sigue la segunda y tercera fase, siendo la última la menos biodisponible.

Aunque los procesos de extracción secuencial no presentan una capacidad de separación perfecta desde un punto de vista geoquímico y requieren bastante tiempo, son los más útiles y satisfactorios para poder entender el comportamiento físico-químico y biodisponibilidad de los metales pesados en los sedimentos.

Los resultados correspondientes a este estudio de especiación metálica (descrito en el apartado IV.B.2.3.2) se detallan en la Tabla A.9 del Anexo 5.2, donde pueden observarse las concentraciones (expresadas mediante su valor medio y desviación estándar) obtenidas en función de las distintas fases. En la Figura IV.B.25 se representan las concentraciones correspondientes a cada fase así como su porcentaje respecto al contenido total. De los resultados obtenidos, se recogen las siguientes conclusiones:

- El fraccionamiento de **Zn** muestra que este metal se encontró mayoritariamente en la fracción residual del sedimento (valor medio de la fracción residual: 66,3%); por lo cual, la mayor parte de este metal estaba ligado a los minerales, formando parte de sus estructuras cristalinas. Este hecho pudo observarse en todos los puntos de muestreo, con excepción de la estación correspondiente a Guadarranque (P4), cuyo porcentaje varió entre un 44% y 54% a lo largo de los cuatro muestreos realizados. Puente Mayorga P5 tampoco registró un porcentaje tan alto en esta fracción residual en los muestreos 2 y 3 (con un 55 y 53%, respectivamente). Exceptuando los puntos de Playa de Getares (P1) e Isla Verde (P2), la segunda fracción mayoritaria es la reducible (valor medio de la fracción reducible: 18,3%), la cual parece igualarse en Palmones (P3) y Guadarranque (P4) con la fracción intercambiable, por lo que el Zn parece más biodisponible en estos puntos, próximos a Acerinox, central térmica y refinerías.

- Respecto al **Cd**, la fracción residual (valor medio de la fracción residual: 80,8%) fue en muchos de los puntos la única de las fracciones que pudo ser determinada (constituyendo el 100% del total), como ocurrió en los puntos de Playa de Getares (P1) e Isla Verde (P2) en los muestreos 3 y 4, y en Guadarranque (P4) y Puente Mayorga (P5) en el último muestreo. Además, constituyó la fracción mayoritaria en los restantes puntos detectados, siendo la fase intercambiable la otra fracción restante (valor medio de la fracción intercambiable: 19,2%). En cuanto a las fases reducible y oxidable, todas las concentraciones se encontraron por debajo del límite de detección. El Cd, por tanto, contiene cierta fracción que sí puede resultar muy biodisponible dentro del medio acuático.

- En cuanto a la especiación de **Pb** en sedimentos, la distribución de este metal en la fracción residual media fue del 59,6%, seguido de la fracción reducible con un valor medio de 27,6%. Diferenciando por puntos de muestreo, la fracción residual resultó muy elevada en los puntos de Playa de Getares (P1) e Isla Verde (P2) (variando entre un 72 y 88% a lo largo de los muestreos realizados), donde la fase oxidable (el metal se encuentra ligado a la materia orgánica y sulfhídrica) fue la segunda más abundante. Por el contrario, en el caso de Palmones, Guadarranque y Puente Mayorga la fase residual se encontró por debajo del 50%, siendo la fase reducible (es decir, el Pb asociado a los óxidos de hierro y manganeso) la que fue fase mayoritaria (42-54%) en estos puntos, a excepción de Puente Mayorga en el primer muestreo, donde la fase oxidable fue mayor que la reducible. La fase intercambiable fue muy baja (Palmones y Guadarranque) o no detectable en la mayoría de los sedimentos estudiados.

- El **Cu** se distribuyó mayoritariamente en el residuo sólido (valor medio de la fracción residual: 75,7%), con valores medios de fracción reducible y oxidable semejante (valor medio de la fracción reducible: 10,6%; valor medio de la fracción oxidable: 12,3%). Por puntos de muestreo, destacaron los valores de fracción residual de Playa de Getares e Isla Verde (70-90%), los cuales no presentaron contenido en la fase intercambiable ni reducible, sólo cierto contenido en Cu asociado a materia orgánica y sulfhídrica (a excepción de Isla Verde que también registró cierta fase reducible en el tercer muestreo). En Palmones, Guadarranque y Puente Mayorga el contenido de la fracción residual fue algo menor presentando cierto contenido de Cu ligado a óxidos de hierro y manganeso (fase reducible), excepto Puente Mayorga en el primer muestreo. También se detectó cierto porcentaje en la fase oxidable, aunque menor que el de la fase reducible (a excepción de Guadarranque e Isla Verde -ya comentado- en los muestreos 1 y 3, respectivamente). La fase intercambiable fue minoritaria, presentándose en Isla Verde (muestreos 3 y 4), Palmones (muestreos 1-4), Guadarranque (muestreos 1-4) o Puente Mayorga (muestreo 1).

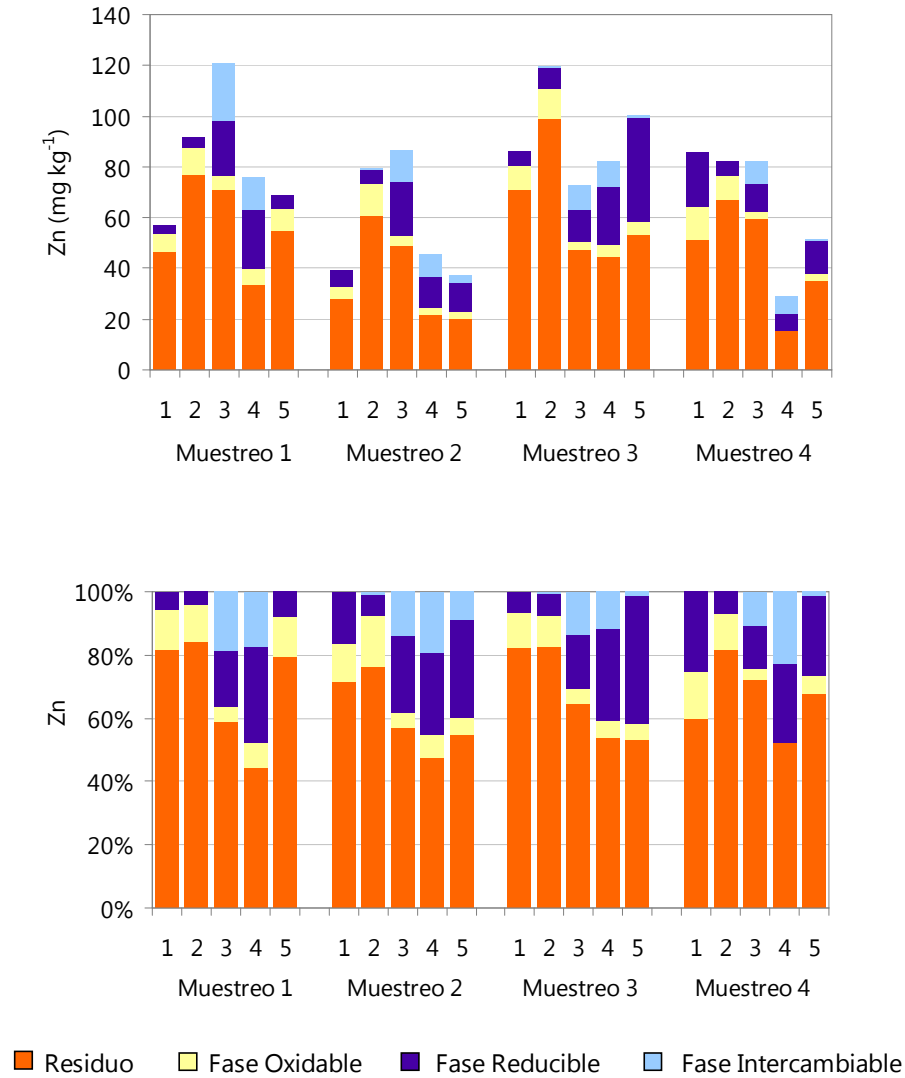


Figura IV.B.25. Concentración y porcentaje de distribución de Zn según el esquema de extracción BCR para especiación de sedimentos

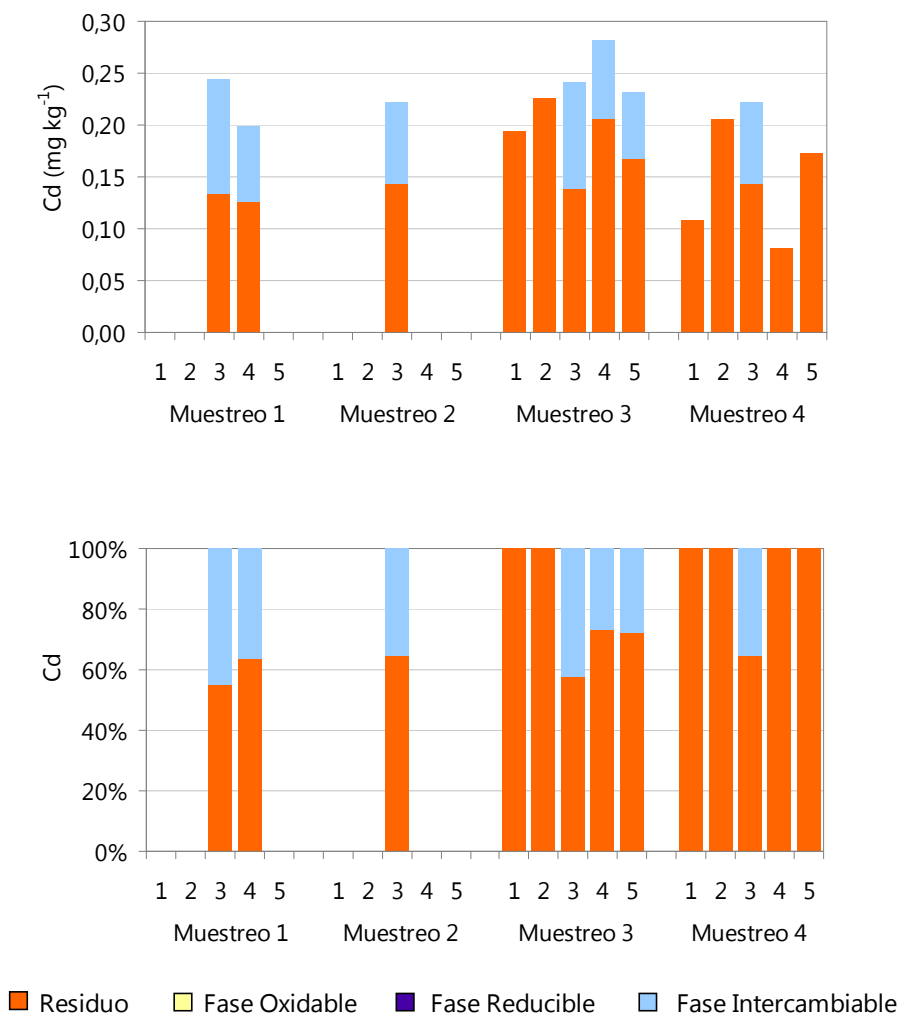


Figura IV.B.25 (cont.). Concentración y porcentaje de distribución de Cd, según el esquema de extracción BCR para especiación de sedimentos

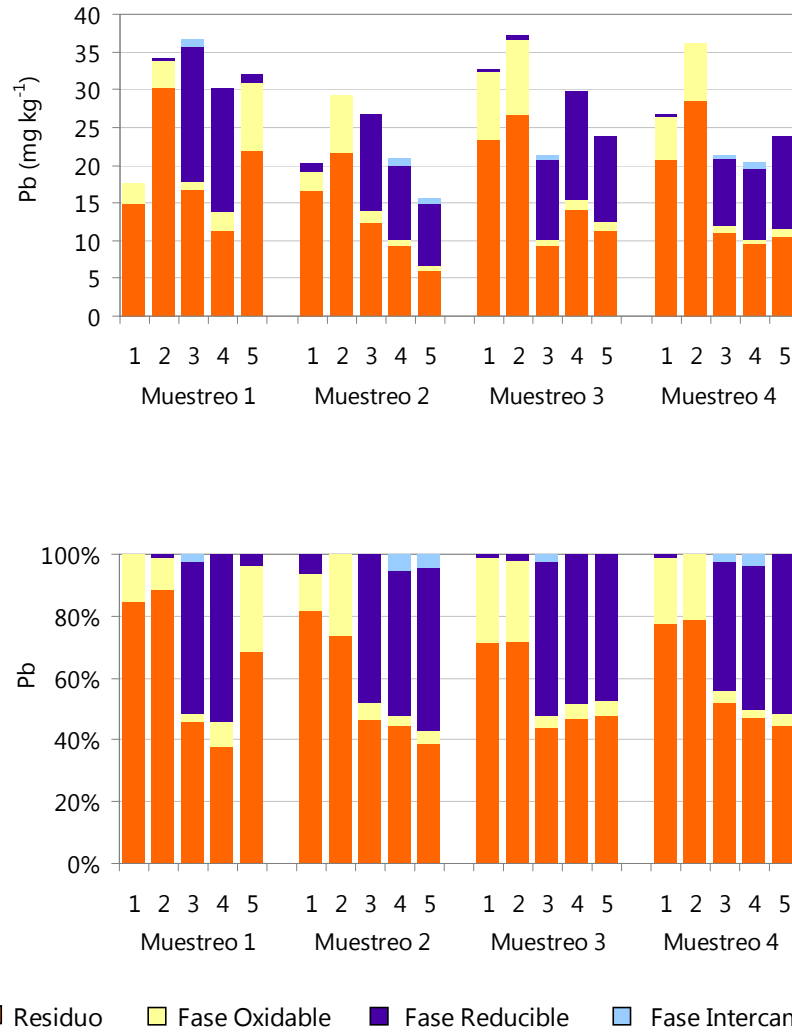


Figura IV.B.25 (cont.). Concentración y porcentaje de distribución de Pb, según el esquema de extracción BCR para especiación de sedimentos

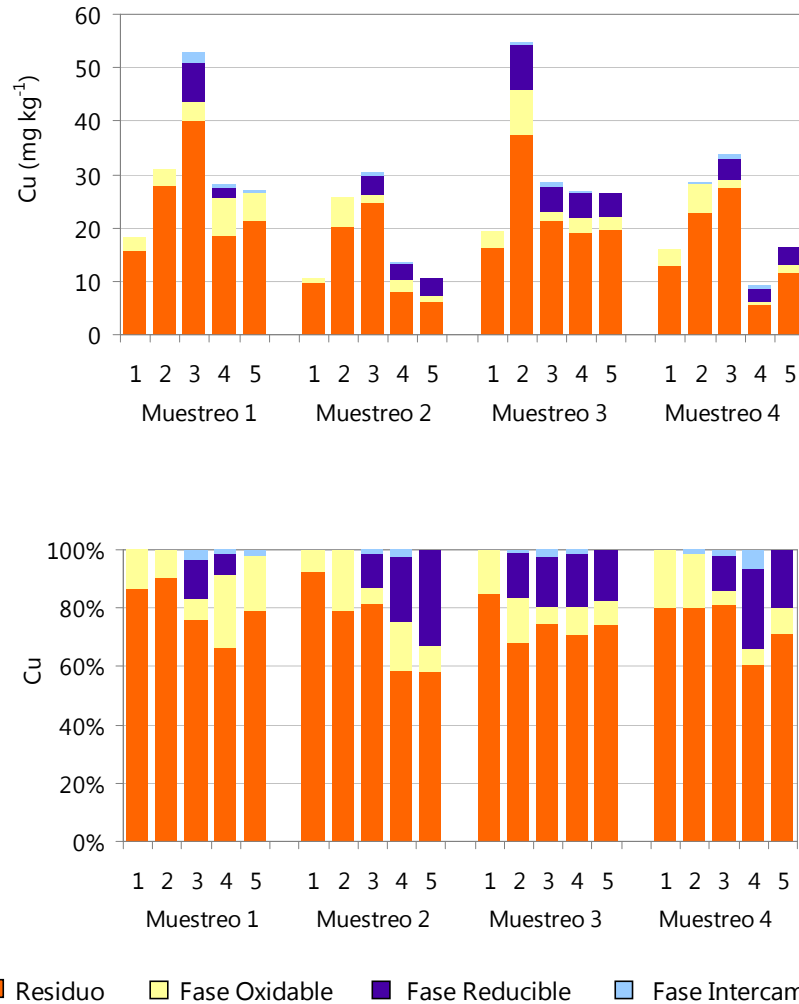


Figura IV.B.25 (cont.). Concentración y porcentaje de distribución de Cu, según el esquema de extracción BCR para especiación de sedimentos

En general se puede decir que el Cu fue el metal menos biodisponible, por presentar valores muy bajos para la fracción intercambiable y también reducible, estando de forma mayoritaria asociado a la fase residual, lo cual se traduce en que se encuentra formando parte de la estructura cristalina del sedimento y es muy difícil que

pase a la columna de agua en condiciones normales. Junto con el Pb, el Cu presentó cierta proporción de metal formando parte de la fase oxidable (valor medio de la fracción oxidable para el Cu: 12,3%; valor medio de la fracción reducible para el Pb: 11,8%), lo cual se explica por la afinidad de este metal a formar complejos con la materia orgánica dada las elevadas constantes de estabilidad de estos compuestos. En situaciones en las que las partículas de sedimentos entren en contacto con agua enriquecida en oxígeno, puede tener lugar un proceso degradación oxidativa donde el Cu puede liberarse y adquirir movilidad [Morillo y col., 2007].

Por otra parte, el Zn y el Pb presentaron un mayor porcentaje de distribución en la fase reducible que el Cu y Cd. Para el Zn y Pb, estos porcentajes relativamente significativos (valor medio de la fracción reducible para el Zn: 18,3%; valor medio de la fracción reducible para el Pb: 27,6%) en esta fase pueden estar relacionados con la conocida capacidad que poseen los óxidos de hierro y manganeso para retener Zn o Pb que se encuentre en disolución. Esta fracción puede llegar a resultar peligrosa para el medio acuático si en las aguas intersticiales se diesen condiciones que favorezcan la disolución de estos compuestos, como por ejemplo, reacciones redox microbiológicas. Estas disoluciones favorecidas por determinados procesos microbiológicos pueden provocar la movilización y liberación de Zn y Pb hacia la columna de agua. El Zn además presentó cierto contenido en la fracción intercambiable, donde se encuentra principalmente asociado a carbonatos. Estos compuestos también tienen la capacidad de capturar el Zn que es introducido al medio acuático por contaminación [Korfali y Davies, 2004; Morillo y col., 2004].

El cadmio presentó una notable distribución en la fase intercambiable, estando enlazado a los carbonatos. Como se comentó en el apartado introductorio de este capítulo, el cadmio no presenta una fuerte afinidad por adsorberse sobre ácidos húmicos y fúlvicos, sino que lo hace sobre partículas fácilmente intercambiables, presentando una gran capacidad de desorción y biodisponibilidad dentro del medio acuático [Neff, 2002]. Esta fuerte asociación entre el Cd con la fracción carbonatada se debe probablemente a la similitud del radio iónico del Cd (0,97 Å) y el del calcio (0,99 Å), por lo que el Cd puede coprecipitar con los carbonatos y sustituir al calcio en la estructura cristalina de la calcita [Korfali y Davies, 2004].

Si se comparan estos resultados con los correspondientes a los de especiación en aguas, puede observarse que fue el Cd el que presentó un mayor porcentaje de este metal en la fracción disuelta, aunque el valor del metal total no era significativo, por lo que tampoco las fracciones. Además, en los sedimentos fue el que se estimó que presentaba una mayor disponibilidad, registrándose un elevado porcentaje mayoritario en la fase intercambiable. Este hecho indica que puede producirse removilización de

este metal desde los sedimentos a las aguas, teniendo tendencia a permanecer en fase disuelta. En el resto de los metales no existe una tendencia clara.

De acuerdo con los resultados extraídos tras estos estudios de especiación metálica en sedimentos, se puede ordenar la disponibilidad de los metales estudiados según el siguiente orden: $Cd > Zn > Cu \approx Pb$, aunque resaltando el bajo contenido total que presentó el Cd en el sedimento. Es el metal con más tendencia a pasar desde el sedimento a la columna de agua; sin embargo, debido a que se encuentra en concentraciones bajas, no entrañará un peligro de tan grandes dimensiones como podría llegar a resultar en el caso de encontrarse en concentraciones mayores. Además, en determinados puntos (como Playa de Getares e Isla Verde) casi todo el Cd existente en sedimentos se encuentra formando parte de la estructura cristalina de los sedimentos.

Con respecto a la especiación en sedimentos también se aplicaron test estadísticos para evaluar las posibles variaciones espaciales y/o estacionales a lo largo de todos los puntos y campañas de muestreo. Así, se realizaron los estudios para todas las fracciones de la especiación, evaluando previamente la normalidad y homocedasticidad de las varianzas. Con respecto a los muestreos realizados, únicamente se encontró diferencia significativa (con un valor de $p=0,0079$) para Cd residual entre los muestreos 2 y 3, aunque la principal diferencia fue no detectar este metal en los dos primeros muestreos en varios de los puntos muestreados. Por otra parte, se observaron diferencias significativas entre los puntos P1 (Playa de Getares) y P3 (Palmones) para Zn intercambiable y los puntos P2 (Isla Verde) y P4 (Guadarranque) para Zn residual, siendo los que presentan mayores valores el P3 para la fracción intercambiable y el P2 para la fracción residual. Así, en Palmones, que fue la zona de mayor contenido metálico, el Zn fue de forma significativa más disponible. Con respecto al Pb, se encontraron diferencias entre los puntos P2 y P3, y P2 y P4 para Pb reducible, y entre los puntos P2 y P4 para Pb residual. De nuevo para este metal, es el punto P2 el que tiene de forma significativa menor fracción reducible comparado con P3 y P4, y más fracción residual. Por lo que, de nuevo donde hay mayor contenido metálico, hay además mayor disponibilidad. En el caso del Cu, la fracción intercambiable mostró diferencias entre los puntos P1 y P3, siendo debida esta diferencia igualmente debida a la mayor disponibilidad del punto P3 que a su vez es el que tiene el mayor contenido metálico. En cuanto a las influencias estacionales, se obtuvo diferencia significativa entre estaciones para la fracción de Cu oxidable ($p=0,0413$).

Cuando se estudiaron las posibles correlaciones entre las fases de la especiación en sedimentos, aplicando el test de Spearman para distribuciones no paramétricas, se encontraron las correlaciones positivas más significativas ($R>0,750$) entre las siguientes fases:

- a) Entre fases iguales:
 - Fase intercambiable: correlación Zn-Cd
 - Fase reducible: correlación Zn-Pb,
 - Fase oxidable: correlaciones Zn-Pb, Zn-Cu, y Pb-Cu
 - Fase residual: correlaciones Zn-Pb y Zn-Cu
- b) Entre fases diferentes:
 - Correlación entre Zn intercambiable y Pb reducible
 - Correlación entre Pb oxidable y Pb residual

Como puede verse, se dieron mayores correlaciones entre fases iguales, lo que indica que el comportamiento geoquímico de estos metales que correlacionan fue similar. Destaca el Zn que tiene un comportamiento diverso: el Zn intercambiable tiene un origen similar al Cd, el Zn reducible tiene un origen semejante al Pb, y en el caso de las fracciones menos disponibles, existe un origen común mineral para Zn, Pb y Cu.

IV.B.5.3. Contenido metálico en muestras biológicas

Las campañas de muestreo de peces se realizaron de forma prácticamente paralela a las de agua y sedimentos, con el fin de poder estudiar y correlacionar las concentraciones metálicas halladas en estos tres compartimentos acuáticos para cada campaña de muestreo en particular. Así, distintas especies de peces fueron capturadas mediante trasmallo en cada uno de los muestreos. Los datos relativos al peso y longitud de las especies se detallan en la Tabla A.4 del Anexo 4, siendo las especies capturadas las siguientes:

- **Muestreo 1:**

Playa de Getares: 3 lenguados, 1 sargo
Isla Verde: captura sin éxito
Palmones: 1 rubio
Guadarranque: captura sin éxito
Puente Mayorga: 1 lenguado, 1 rubio

- **Muestreo 2:**

Playa de Getares: 14 lenguados, 1 sargo
Isla Verde: 3 lenguados
Palmones: 1 lenguado, 12 rubios
Guadarranque: 1 lenguado
Puente Mayorga: 2 lenguados

- **Muestreo 3:**

Playa de Getares: 6 lenguados, 1 rubio, 4 rascacios
Isla Verde: 4 rascacios
Palmones: 4 lenguados, 2 rubios
Guadarranque: 3 rubios, 2 rascacios
Puente Mayorga: 3 lenguados, 1 rubio

- **Muestreo 4:**

Playa de Getares: 7 lenguados, 1 rascacio, 1 sargo
Isla Verde: 2 sargos
Palmones: captura sin éxito
Guadarranque: 2 lenguados, 1 rubio, 3 rascacios
Puente Mayorga: captura sin éxito

Algunas de las capturas no tuvieron éxito, a pesar del empeño de los pescadores en la toma de muestras. No obstante, el número de ejemplares fue suficiente para realizar el estudio. Así, no existen datos referidos a los puntos de Isla Verde y Guadarranque del primer muestreo, ni de Palmones y Puente Mayorga del último muestreo, por carecer de muestras biológicas.

La totalidad de los resultados obtenidos se presentan detallados en la Tabla A.10 del Anexo 5.3, donde se recogen las distintas concentraciones de Zn, Cd, Pb y Cu (expresadas como mg de metal por kg de peso seco de muestra biológica analizada) encontradas en cada uno de los tejidos (branquias, hígado y músculo) de los distintos peces estudiados en cada punto de muestreo y para cada una de las campañas de muestreo. Por otro lado, en la siguiente Tabla IV.B.21 se muestran las concentraciones medias y el rango de concentración de los metales estudiados para cada uno de los tejidos en los distintos puntos de muestreo.

De estos resultados se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- En el caso del **Zn**, las concentraciones medias más elevadas se registraron en hígado, seguido de branquias y músculo, para todos los puntos de muestreo. Los mayores valores medios de Zn en muestras de hígado se obtuvieron en la estación de muestreo de Isla Verde (206,82 mg kg⁻¹), siendo el rango más amplio para este punto P2 (71,90-475,08 mg kg⁻¹) y el punto de la playa de Getares P1 (17,41-503,00 mg kg⁻¹). No obstante, en el punto de Getares se registró un valor de concentración máxima muy significativo en branquias, correspondiente a un ejemplar de rubio (1.152,54 mg kg⁻¹), durante el tercer muestreo. El punto P1 de la Playa de Getares es el que mostró mayor

valor medio de Zn en branquias ($98,14 \text{ mg kg}^{-1}$), siendo bastante similar en los 4 puntos de muestreo restantes. Además, se observa un valor relativamente alto ($259,84 \text{ mg kg}^{-1}$) en una muestra de músculo de un rubio analizado en el punto de Palmones del segundo muestreo. En músculo, los valores medios fueron bastante homogéneos para todos los puntos estudiados.

- Para el **Cd**, la mayoría de los valores medios en branquias y músculo se encontraron por debajo del límite de detección de la técnica de medida empleada, siendo algo superiores en las muestras de hígado (con un valor máximo de $3,83 \text{ mg kg}^{-1}$, correspondiente a un rascacio procedente de Isla Verde capturado durante el tercer muestreo). Los valores medios en hígado se mantuvieron bastante homogéneos en todos los puntos de muestreo, siendo algo superior en el punto de Isla Verde ($1,36 \text{ mg kg}^{-1}$).

- Respecto a los niveles de **Pb**, el metal tiende a acumularse principalmente en los tejidos de branquias e hígado. En músculo, el valor medio se encontró por debajo del límite de detección en todos los puntos, excepto en Guadarranque, donde se observó una concentración media de $0,20 \pm 0,45 \text{ mg kg}^{-1}$, observándose un valor máximo de $3,13 \text{ mg kg}^{-1}$ en un lenguado registrado en el punto de Playa de Getares en el tercer muestreo. Con respecto a los tejidos de branquias e hígado, los puntos de Playa de Getares, Palmones y Puente Mayorga muestran su valor medio y concentración máxima registrada en muestras de branquias.

- En referencia al **Cu**, tanto los valores medios como los valores máximos de concentración fueron registrados en el hígado para todas las estaciones de muestreo. El segundo órgano diana fue las branquias y, por último, el músculo. En branquias los valores medios fueron similares para todos los puntos. Además, se registraron los valores máximos para este tejido, en torno a unos 30 mg kg^{-1} , en lenguados capturados en Puente Mayorga y Palmones a lo largo del segundo muestreo. Como se ha comentado, el hígado fue el tejido de acumulación preferente de este metal, con valores mucho más altos, entre los que destacan los puntos de Playa de Getares y Puente Mayorga, con valores medios de $313,33 \pm 335,11 \text{ mg kg}^{-1}$ y $268,38 \pm 547,95 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente (registrados en especímenes de lenguados tomados de estos puntos). Respecto a los tejidos de músculo analizados, los valores medios fueron bastante homogéneos, hallándose la concentración más alta ($10,14 \text{ mg kg}^{-1}$) en un lenguado correspondiente al punto de Guadarranque durante el muestreo 2.

Tabla IV.B.21. Intervalos y concentraciones medias de Zn, Cd, Pb y Cu encontrados en branquia, hígado y músculo en los distintos puntos de muestreo estudiados (mg kg⁻¹ de peso seco)

Punto de muestreo	Tejido ⁽¹⁾	Intervalos y concentraciones medias (mg kg ⁻¹)			
		Zn	Cd	Pb	Cu
1 Playa de Getares	Branquias (n=40)	(5,89-1.152,54) 98,14±195,51	(<LD) <LD	(<LD-39,08) 3,05±7,35	(0,55-10,56) 3,22±1,60
	Hígado (n=33)	(17,41-503,00) 121,32±86,14	(0,06-2,90) 0,96±0,70	(<LD-7,71) 2,76±2,05	(3,76-1.492,31) 313,33±335,11
	Músculo (n=40)	(12,33-43,78) 20,07±7,47	(<LD) <LD	(<LD-3,13) <LD ⁽²⁾	(0,28-1,98) 0,82±0,37
2 Isla Verde	Branquias (n=9)	(38,45-80,67) 61,19±12,04	(<LD-0,21) <LD	(<LD-4,63) 1,25±1,45	(1,20-3,78) 2,45±0,93 ⁽³⁾
	Hígado (n=7)	(71,90-475,08) 206,82±136,79	(0,22-3,83) 1,36±1,55	(<LD-2,06) 0,73±0,81	(9,28-635,56) 104,41±234,33
	Músculo (n=8)	(12,50-46,58) 23,96±11,50	(<LD) <LD	(<LD) <LD	(0,30-2,02) 0,74±0,67
3 Palmones	Branquias (n=18)	(<LD-74,30) 65,82±17,43	(<LD-0,10) <LD	(<LD-7,06) 2,14±1,78	(<LD-31,83) 4,37±8,23
	Hígado (n=18)	(67,54-249,97) 127,26±43,95	(<LD-2,53) 0,38±0,58	(<LD-5,12) 1,03±1,39	(9,52-426,23) 91,64±131,81
	Músculo (n=21)	(<LD-259,84) 29,96±53,05	(<LD-0,40) <LD	(<LD-1,06) <LD	(<LD-2,48) 1,17±0,64 ⁽⁴⁾
4 Guadarranque	Branquias (n=12)	(57,59-111,29) 69,73±19,51	(<LD-0,11) <LD	(<LD-2,31) 0,76±0,74	(1,39-9,87) 2,91±2,28
	Hígado (n=11)	(13,71-298,99) 138,87±90,12	(<LD-1,73) 0,79±0,51	(<LD-2,56) 0,88±0,96	(6,96-262,22) 69,05±89,61
	Músculo (n=11)	(11,68-41,51) 21,97±8,04	(<LD-0,10) <LD	(<LD-1,49) 0,20±0,45	(0,35-10,14) 1,55±2,86
5 Puente Mayorga	Branquias (n=8)	(<LD-151,47) 67,73±41,36	(<LD-0,52) <LD	(0,51-8,20) 2,58±3,06	(2,10-34,08) 7,43±10,81
	Hígado (n=7)	(62,99-126,99) 103,56±27,40	(<LD-1,22) 0,47±0,48	(<LD-7,56) 2,35±2,90	(1,97-1504,65) 268,38±547,95
	Músculo (n=7)	(16,29-25,48) 19,46±3,04	(<LD) <LD	(<LD-0,29) <LD	(0,57-2,10) 1,03±0,53

⁽¹⁾ n: número de muestras analizadas; ⁽²⁾ n=39; ⁽³⁾ n=8; ⁽⁴⁾ n=20

Unificando todas las estaciones de muestreo, se puede concluir que el orden de acumulación de los metales analizados en los distintos tejidos biológicos fue para valores medios en branquias (mg kg⁻¹): 81,13±133,68 para Zn, 0,01±0,06 para Cd, 2,32±5,18 para Pb, 4,06±5,26 para Cu; para valores medios en hígado (mg kg⁻¹): 131,51±83,09 para Zn, 0,79±0,79 para Cd, 1,85±1,97 para Pb, 202,09±305,95 para Cu;

para valores medios en músculo (mg kg^{-1}): $23,01 \pm 26,75$ para Zn, $0,01 \pm 0,04$ para Cd, $0,13 \pm 0,42$ para Pb y $1,01 \pm 1,11$ para Cu. De esta forma, para cada tejido tenemos que: Branquias: $\text{Zn} > \text{Cu} > \text{Pb} > \text{Cd}$; Hígado: $\text{Cu} \approx \text{Zn} > \text{Pb} > \text{Cd}$; Músculo: $\text{Zn} > \text{Cu} > \text{Pb} > \text{Cd}$.

Además, se agruparon y trataron estadísticamente todos los resultados para Zn, Cd, Pb y Cu obtenidos en los distintos tejidos en función de las diferentes especies de peces analizadas (lenguado, rascacio, rubio y sargo). Éstos pueden observarse tanto en la Tabla IV.B.22 (donde se han unificado todas las campañas y puntos de muestreo), como gráficamente representados mediante cajas de Box-Whisker (Figura IV.B.26, IV.B.27, IV.B.28, IV.B.29).

Tabla IV.B.22. Intervalos y concentraciones medias de Zn, Cd, Pb y Cu encontrados en los distintos tejidos (branquias, hígado y músculo) de las especies marinas estudiadas (lenguados, rascacios, rubios y sargos) (mg kg^{-1} de peso seco)

Especie de pez	Tejido ⁽¹⁾	Intervalos y concentraciones medias (mg kg^{-1})			
		Zn	Cd	Pb	Cu
Lenguado	Branquias (n=46)	(5,89-151,47) $58,52 \pm 18,69$	(<LD-0,52) <LD	(<LD-39,08) $2,76 \pm 6,46$	(0,55-34,08) $5,29 \pm 6,85$
	Hígado (n=39)	(13,71-157,36) $98,74 \pm 32,25$	(<LD-2,90) $0,84 \pm 0,61$	(<LD-7,71) $2,95 \pm 2,03$	(20,37-1504,65) $356,05 \pm 353,84$
	Músculo (n=46)	(<LD-32,28) $17,48 \pm 5,14$	(<LD-0,10) <LD	(<LD-0,34) <LD ⁽²⁾	(<LD-10,14) $0,98 \pm 1,44$
Rascacio	Branquias (n=15)	(38,45-111,29) $68,16 \pm 22,16$	(<LD-0,21) <LD	(<LD-2,48) $0,76 \pm 0,80$	(1,26-4,22) $2,28 \pm 0,96^{(3)}$
	Hígado (n=12)	(68,29-475,08) $223,68 \pm 118,21$	(0,16-3,83) $1,01 \pm 1,10$	(<LD-1,51) $0,20 \pm 0,48$	(3,76-50,58) $17,64 \pm 13,39$
	Músculo (n=15)	(14,03-41,51) $26,35 \pm 8,01$	(<LD) <LD	(<LD-3,13) $0,32 \pm 0,82$	(0,30-2,02) $0,98 \pm 0,59$
Rubio	Branquias (n=21)	(<LD-1152,54) $112,00 \pm 239,29$	(<LD) <LD	(<LD-4,19) $1,37 \pm 1,08$	(<LD -8,56) $2,96 \pm 1,85$
	Hígado (n=20)	(62,99-503,00) $144,68 \pm 94,18$	(<LD-2,53) $0,39 \pm 0,56$	(<LD-2,38) $0,65 \pm 0,57$	(1,97-179,49) $29,58 \pm 39,34$
	Músculo (n=21)	(11,68-259,84) $30,47 \pm 52,72$	(<LD-0,40) <LD	(<LD -1,49) $0,18 \pm 0,42$	(0,35-2,48) $1,11 \pm 0,58^{(4)}$
Sargo	Branquias (n=5)	(68,53-648,51) $198,46 \pm 252,11$	(<LD) <LD	(1,11-20,13) $6,87 \pm 7,60$	(1,20-2,93) $2,23 \pm 0,69$
	Hígado (n=5)	(65,70-157,89) $113,18 \pm 41,95$	(0,40-3,26) $1,50 \pm 1,28$	(0,62-5,70) $2,09 \pm 2,05$	(10,88-607,24) $133,88 \pm 264,66$
	Músculo (n=5)	(15,97-46,58) $32,50 \pm 13,08$	(<LD) <LD	(<LD-0,94) $0,19 \pm 0,42$	(0,33-1,35) $0,88 \pm 0,50$

⁽¹⁾ n: número de muestras analizadas; ⁽²⁾ n=45; ⁽³⁾ n=14; ⁽⁴⁾ n=20

En cuanto a los resultados mostrados en la tabla, se debe señalar que los altos valores de desviación estándar obtenidos en la mayoría de los casos, son debidos a que se han considerado valores medios, empleando para su obtención todos los puntos y campañas de muestreo, de ahí que los datos no sean tan homogéneos. Además, se debe tener en cuenta el tiempo de vida medio de cada especie, de forma que, en un mismo punto, para aquellas que lleven más tiempo en la zona, es de esperar un mayor grado de acumulación.

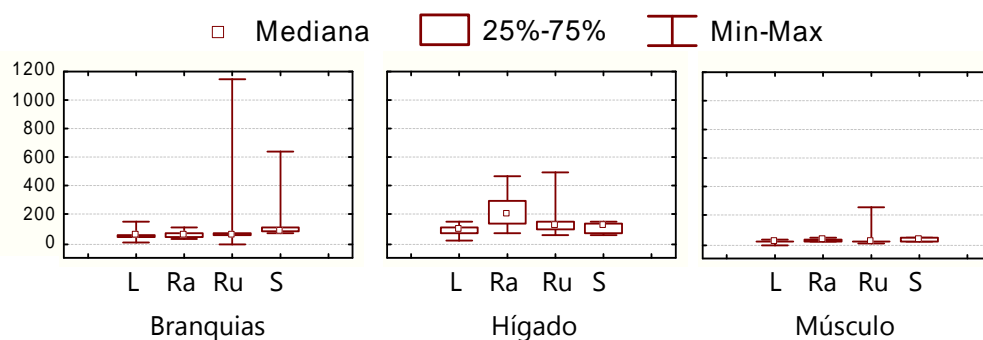


Figura IV.B.26. Cajas de Box-Whisker de Zn (mg kg^{-1}) en lenguados (L), rascacios (Ra), rubios (Ru) y sargos (S) para branquias, hígado y músculo

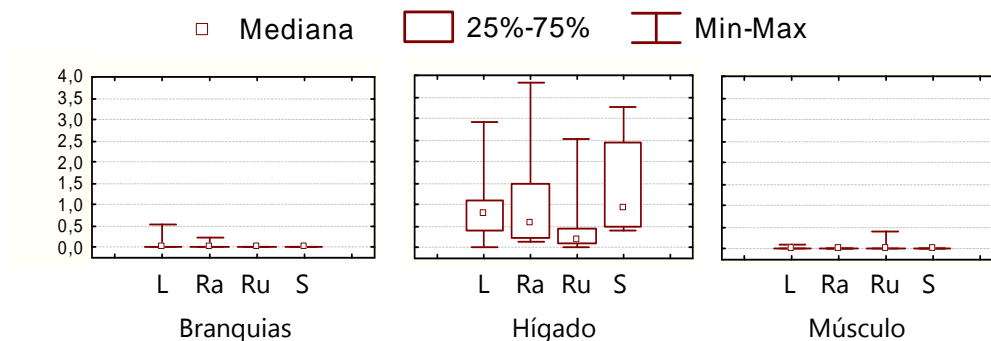


Figura IV.B.27. Cajas de Box-Whisker de Cd (mg kg^{-1}) en lenguados (L), rascacios (Ra), rubios (Ru) y sargos (S) para branquias, hígado y músculo

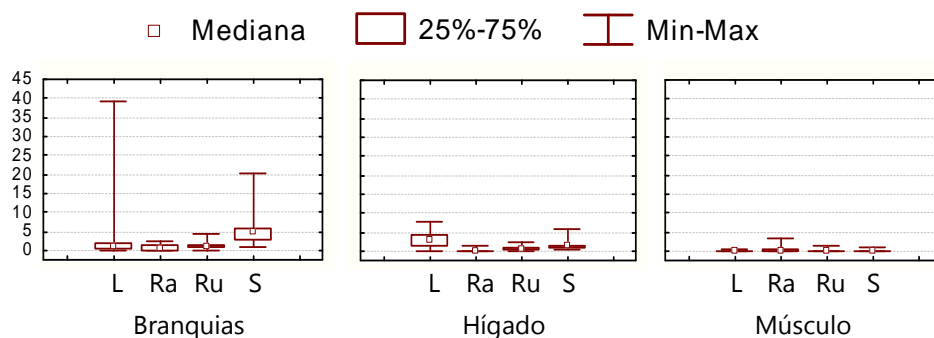


Figura IV.B.28. Cajas de Box-Whisker de Pb (mg kg⁻¹) en lenguados (L), rascacios (Ra), rubios (Ru) y sargos (S) para branquias, hígado y músculo

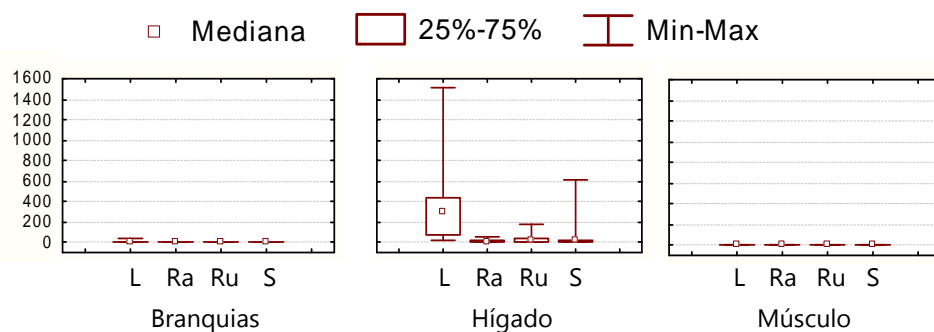


Figura IV.B.29. Cajas de Box-Whisker de Cu (mg kg⁻¹) en lenguados (L), rascacios (Ra), rubios (Ru) y sargos (S) para branquias, hígado y músculo

Se observa que el Zn se acumuló preferentemente en branquias e hígado, destacando los tejidos de branquias de las especies de rubio y sargo, así como el hígado de rascacios y rubios. En músculo, las máximas concentraciones de este metal se encontraron en las especies de rubios. Para Cd, la acumulación es notablemente superior en hígado en las 4 especies, y no apreciable en branquias y músculo de estas especies, siendo más destacable el valor medio en hígado de sargo. El Pb experimenta una mayor acumulación en branquias (sobre todo de lenguado y sargo), además de hígado de lenguado y sargo y músculo de rascacio (en mucho menor grado). El Cu tiende a acumularse en hígado de lenguados de forma muy significativa, seguido por sargos y, en menor medida, por rubios. Por el contrario, experimenta valores muy bajos en los tejidos de branquias y músculo.

A partir de los resultados obtenidos, se analizaron estadísticamente las diferencias entre los distintos tejidos estudiados, obteniéndose diferencia entre todos ellos para los 4 metales, a excepción del nivel de Cd en hígado, por encima y diferente de forma significativa del contenido en los tejidos de branquias y músculo en el caso del Cd (ya que la mayoría de estos valores se encontraban cercanos o por debajo del límite de detección), así como para Pb en músculo, inferior y muy diferente del nivel en los tejidos de branquias e hígado (estos últimos con mayor acumulación). Además, se analizó cada tejido de forma conjunta para todas las especies de peces analizadas, encontrándose las diferencias que se reflejan en la Tabla IV.B.23. En esta tabla destacan las correlaciones de lenguado con otras especies para todos los metales, sobre todo para Zn y Pb, siendo el Cd el que ofrece una menor correlación entre peces. Sólo en el caso del Pb, se encontraron correlaciones que no fueran con lenguado (rascacio y sargo en branquia e hígado).

Por otra parte, se analizó, de forma independiente, cada tejido de cada especie, con objeto de estudiar su posible variabilidad en función de los muestreos realizados y los puntos de muestreo evaluados. Así, para lenguados, se encontraron diferencias para el nivel de Pb en tejido de branquias entre los muestreos 3 y 4, así como entre los puntos de Palmones (P3) y Guadarranque (P4). En hígado de lenguado, se encontraron diferencias entre los muestreos 1 y 4, pero no entre los puntos de muestreo. En músculo de lenguado no se detectaron diferencias significativas a lo largo de los muestreos ni de los puntos analizados. En la especie de rascacio, sólo se dispuso de muestras biológicas en los muestreos 3 y 4. No existía diferencia en función de los muestreos para ninguno de los tejidos (branquias, hígado y músculo). Por otro lado, sólo fue posible capturar rascacios en los puntos de Playa de Getares, Isla Verde y Guadarranque, encontrándose diferencias significativas únicamente para el Zn en branquias entre los puntos de Playa de Getares (P1) e Isla Verde (P2) con respecto a la estación de Guadarranque (P4). En la especie de rubio, se encontraron diferencias para Cu en branquias entre los muestreos 2 y 3, y para Cd en hígado entre los muestreos 1 y 3. Por el contrario, para ningún metal se encontró diferencia entre los puntos de muestreo. Se debe tener en cuenta que para los tejidos de branquias e hígado, no se disponía de muestra para la estación de Isla Verde, y en el caso de los tejidos de músculo, tampoco para el punto de Playa de Getares. Por último, para la especie de sargo no se encontró diferencia en ninguno de los 4 metales para ningún tejido respecto a los muestreos o puntos de muestreo. No obstante, conviene destacar que sólo se pudo contar con muestras biológicas de sargo en los muestreos 1, 2 y 4. En relación a los puntos de muestreo, sólo pudieron estudiarse los puntos P1 y P2, por no disponer de sargos en los demás puntos.

Tabla IV.B.23. Diferencias significativas encontradas estadísticamente para los distintos metales estudiados en las distintas especies de peces y tejidos

Tejido	Metales estudiados			
	Zn	Cd	Pb	Cu
Branquia	L y Ru L y S		L y S Ra y S	L y Ra
Hígado	L y Ra	L y Ru;	L y Ru; L y Ra Ra y S	L y Ru L y Ra
Músculo	L y Ra L y S			

L: Lenguado; Ra: Rascacio; Ru: Rubio; S: Sargo

Finalmente, se ha procedido a comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con resultados de otros ecosistemas similares encontrados en la bibliografía. Se destacan los relativos a zonas como la Bahía de Cádiz (próxima a la Bahía de Algeciras) y la Ría de Huelva. De esta comparativa, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- En el caso del Zn, los contenidos metálicos medios en branquias, hígado y músculo en la Bahía de Cádiz fueron 76,18; 80,83 y 32,67 mg kg⁻¹, respectivamente. Por otra parte, los valores medios en branquias, hígado y músculo en la Ría de Huelva, fueron 73,70; 88,20 y 23,68 mg kg⁻¹, respectivamente [Vicente Martorell, 2010]. Como se desprende de dichos datos, los resultados obtenidos para estos dos ecosistemas son similares entre sí. Para el presente estudio, los resultados medios obtenidos (branquias/hígado/músculo: 81,13; 131,50; y 23,01 mg kg⁻¹) se encuentran algo por debajo en el caso del contenido medio en músculo, y presentan valores algo más elevados en hígado. Aún así, no difieren mucho. Por otra parte, otro estudio realizado en la Bahía de Cádiz referencia valores en branquias, hígado y músculo de 94,5; 120,8 y 26,1 mg kg⁻¹, respectivamente [Galindo y col., 2012]. Lo que corresponde a un contenido metálico similar a los encontrados para todos los tejidos en el presente estudio.

- En la Bahía de Cádiz los niveles medios de **Cd** detectados fueron 0,03; 0,26 y 0,04 mg kg⁻¹ en muestras de branquias, hígado y músculo. En la Ría de Huelva los niveles medios de Cd en branquias, hígado y músculo de peces fueron 0,56; 1,82 y 0,01 mg kg⁻¹, respectivamente [Vicente Martorell, 2010]. En comparación con el presente estudio (branquias/hígado/músculo: 0,01/0,79/0,01 mg kg⁻¹), los valores medios en hígado se encontraron entre los correspondientes a estas muestras en la Bahía de Cádiz y la Ría

de Huelva. Asimismo, en la Bahía de Cádiz se han registrado valores en lenguados para branquias, hígado y músculo de 0,40; 0,55 y 0,08 mg kg⁻¹ respectivamente [Galindo y col., 2012]. En comparación con estos últimos, los valores en hígado se encuentran próximos, estando los valores de branquias y músculo en la Bahía de Algeciras por debajo de los valores de ambos ecosistemas acuáticos.

- En el caso del **Pb**, las concentraciones en los tejidos de peces de la Bahía de Cádiz fueron 0,39 mg kg⁻¹ en branquias, 0,14 mg kg⁻¹ en hígado y 0,06 mg kg⁻¹ en músculo; mientras que en la Ría de Huelva se detectaron 4,52 mg kg⁻¹ en branquias, 1,46 mg kg⁻¹ en hígado y 0,40 mg kg⁻¹ en músculo [Vicente Martorell, 2010]. En la Bahía de Algeciras (branquias/hígado/músculo: 2,31/1,85/0,13 mg kg⁻¹) se obtuvieron niveles medios superiores a los de la Bahía de Cádiz para branquias e hígado, y a los de la Ría de Huelva en hígado. Otros resultados en la Bahía de Cádiz muestran concentraciones de 2,72; 0,09 y 0,01 mg kg⁻¹ para muestras analizadas en branquias, hígado y músculo de lenguados [Galindo y col., 2012]. En este caso, se observa que se trata de concentraciones similares a las encontradas en este estudio en el caso de branquias y músculo, pero menores para hígado.

- Los valores medios de **Cu** en la Bahía de Cádiz para branquias, hígado y músculo de peces fueron 22,88; 196,86 y 0,83 mg kg⁻¹. En la Ría de Huelva fueron detectados 11,90 mg kg⁻¹ en branquias, 433,45 mg kg⁻¹ en hígado y 1,41 mg kg⁻¹ en músculo [Vicente Martorell, 2010]. Los correspondientes a la Bahía de Algeciras (branquias/hígado/músculo: 4,06/202,09/1,01 mg kg⁻¹), fueron algo inferiores a los de la Ría de Huelva para los 3 tejidos. Por otro lado, en este estudio se superaron los valores medios de la Bahía de Cádiz en las muestras de hígado, siendo algo menores en branquias, y similares en músculo. Galindo y col. determinaron concentraciones con valores de 5,12; 441,6 y 0,78 mg kg⁻¹ en branquias, hígado y músculo [Galindo y col., 2012]; similares para branquias y músculo respecto a la Bahía de Algeciras, pero algo superiores para hígado en Cádiz.

IV.B.6. Comparación del contenido metálico

En el presente apartado se han realizado estudios comparativos a partir de los resultados obtenidos en las distintas muestras medioambientales: aguas, sedimentos y peces (mediante análisis del contenido metálico total en todos los compartimentos y especiación en agua y sedimentos). De esta forma, se pretende estudiar de forma integral el estado de contaminación en cada uno de estos compartimentos ambientales de la Bahía de Algeciras, y la posibilidad de comparar entre sí las cinco

estaciones de muestreo seleccionadas para el estudio. Además, los resultados experimentales han sido comparados con respecto a niveles de referencia o niveles guía encontrados en la bibliografía.

IV.B.6.1. Comparación de la contaminación entre los puntos de muestreo seleccionados

Para comparar el contenido metálico en los cinco puntos de muestreo (Playa de Getares, Isla Verde, Palmones, Guadarranque y Puente Mayorga), se ha empleado el índice de contaminación metálica. Se entiende como índice de un ecosistema cualquier indicador que proporciona información acerca de las condiciones y/o características del propio sistema, de manera que la información suministrada sea de fácil interpretación. De esta manera, se calculó el índice de contaminación metálica (Metal Pollution Index, MPI) en muestras de agua, sedimentos y tejidos de peces en los 5 puntos, mediante la siguiente expresión [Usero y col., 1996; Usero y col., 1997; Usero y col., 2005; Chaudhuri y col., 2007]:

$$MPI = (Cf_1 \times Cf_2 \times \dots \times Cf_n)^{1/n}$$

donde el término Cf_n representa la concentración del metal n en la muestra, y se calcula como la concentración metálica media en las 4 campañas de muestreo realizadas. Es frecuente encontrar la aplicación de este índice en estudios muy diversos, como biomonitorización en ecosistemas acuáticos [Giusti, 1999], contaminación en sedimentos [Roychoudhury y Starke, 2006; Das y Chakrapani, 2011; Varol, 2011] o estudios atmosféricos y con vegetales [Sharma y col., 2008].

En aguas, se calculó este índice de contaminación MPI tanto para el contenido metálico total como para el disuelto (Figura IV.B.30 y IV.B.31). En aquellos casos en los que el metal no fue detectado, se utilizó para sustituir en la ecuación el valor del límite de detección del metal, debido a que si se multiplica por cero, el índice se anula, y si no se utiliza para el cálculo del índice, éste no refleja la baja cantidad de metal que existe en el punto en cuestión.

Como puede observarse en la Figura IV.B.30, los valores máximos de MPI para el contenido metálico total en aguas se detectan en los puntos P1, P2 y P3 (Playa de Getares, Isla Verde y Palmones), siendo el punto de Palmones el que refleja un mayor valor para este índice. Por otra parte, la Figura IV.B.31 muestra los índices de contaminación metálica en la fase disuelta en aguas, donde por lo general son

menores para todos los puntos de muestreo, registrándose el máximo en el punto de Isla Verde y Palmones.

El índice de contenido metálico también fue calculado en sedimentos. Como puede observarse en la Figura IV.B.32, fue la estación de Palmones la que presentó una mayor contaminación metálica, con un índice de contaminación metálica (MPI) de aproximadamente 12 mg kg^{-1} .

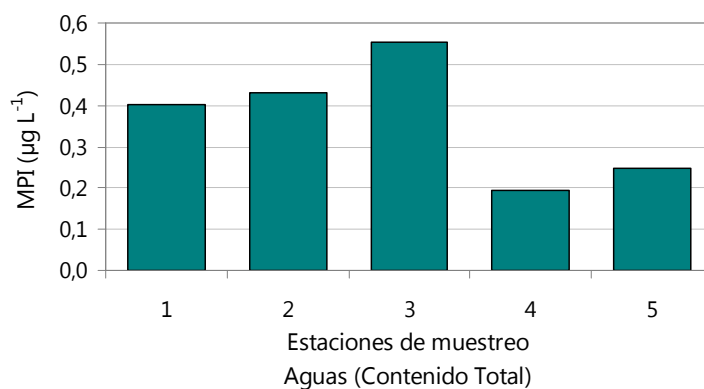


Figura IV.B.30. Índices de contaminación metálica para los distintos puntos de muestreo basados en el contenido metálico total en agua

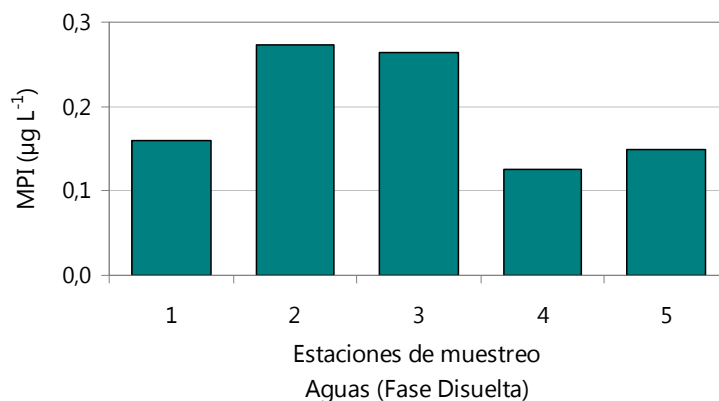


Figura IV.B.31. Índices de contaminación metálica para los distintos puntos de muestreo basados en el contenido metálico disuelto en agua

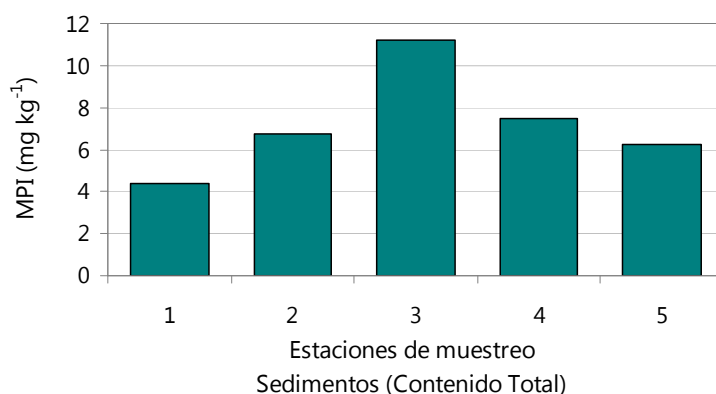


Figura IV.B.32. Índices de contaminación metálica para los distintos puntos de muestreo basados en el contenido metálico en sedimentos

Con respecto a los resultados correspondientes a los peces, se ha calculado el índice de contaminación metálica total (Figura IV.B.33), y los índices según el tejido (Figuras IV.B.34, IV.B.35 y IV.B.36 para branquias, hígado y músculo, respectivamente), distinguiéndose entre especie y puntos de muestreo. Al igual que para el MPI, cuando las muestras tuvieron concentración inferior se utilizó para sustituir en la ecuación el valor del límite de detección del metal, y a partir de ahí se calcularon los valores del índice MPI. La falta de valores en determinados puntos para determinadas especies, se debe a la falta de ejemplares de estos peces. Los índices de contenido metálico medio (unificando tejidos de branquias, hígado y músculo) presentan un valor máximo en el punto de Getares para sargo, seguido de la especie de lenguado en todos los puntos de muestreo. Para branquias, destaca el valor del índice en la especie sargo en el punto de Playa de Getares y en lenguados para los puntos de Palmones y Puente Mayorga. En el punto de Guadarranque, las 3 especies de peces estudiadas mostraron un índice de contenido metálico bastante similar. En los tejidos de hígado, se obtienen los índices máximos en lenguados para todos los puntos, siendo bastante similar para sargo en el punto P1 y para rubio en el punto P4. En muestras de músculo, se obtuvieron índices de contaminación bastante similares para todas las especies en los puntos de Isla Verde, Palmones, Guadarranque y Puente Mayorga. Fue en el punto de Playa de Getares donde se dieron los mayores índices, sobre todo para la especie de sargo, seguida de rascacio y lenguado.

A partir de los MPI calculados para cada tejido se pueden ordenar éstos según la siguiente tendencia general: hígado > branquias > músculo para las 4 especies de peces estudiadas.

Así, se puede concluir que para los metales empleados, los tejidos de hígado y, en segundo lugar, branquias, son considerados como los principales tejidos diana; es decir, son los órganos con mayor tendencia a acumular metales captados desde el medio externo. Dado que la acumulación se produce de manera más significativa en el hígado (frente a branquias y músculos de un mismo ejemplar), puede considerarse un tejido adecuado en cuanto a estudios cuyo objetivo sea evaluar diferencias de contaminación entre especies de un ecosistema. En cambio, el músculo es un órgano que no tiende a bioacumular este tipo de metales pesados y resulta menos sensible a la hora de detectar una posible contaminación.

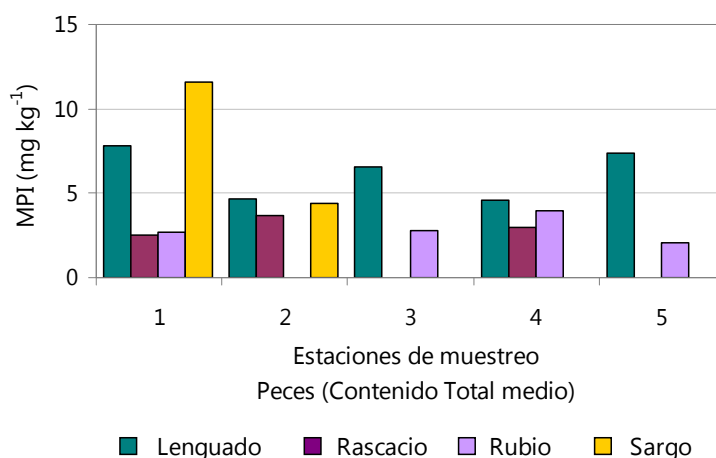


Figura IV.B.33. Índices de contaminación metálica media en peces

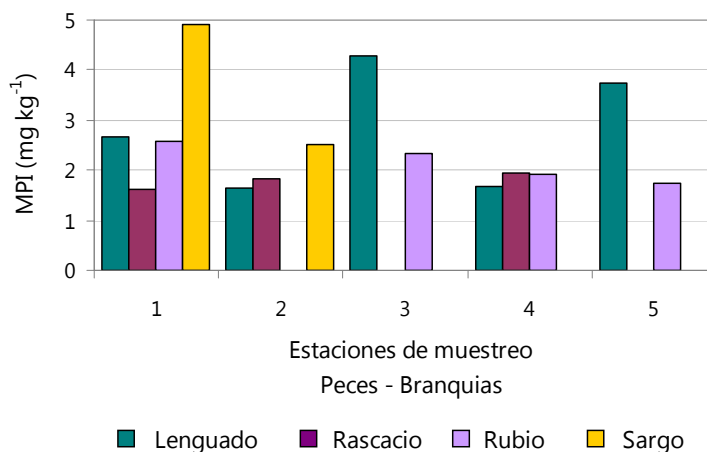


Figura IV.B.34. Índices de contaminación metálica media para branquias de peces

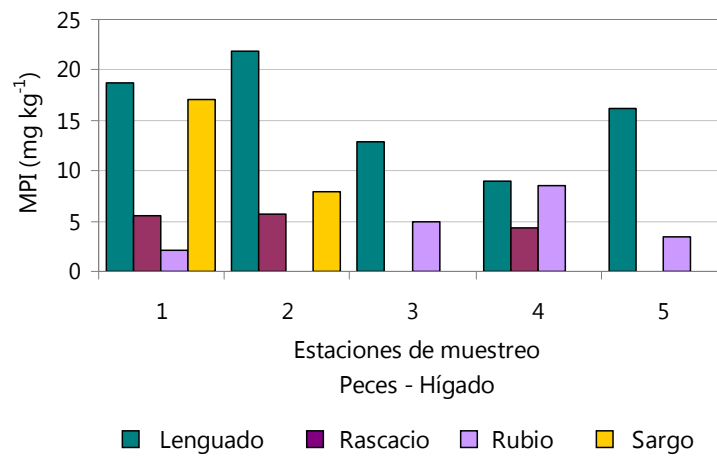


Figura IV.B.35. Índices de contaminación metálica media para hígado de peces

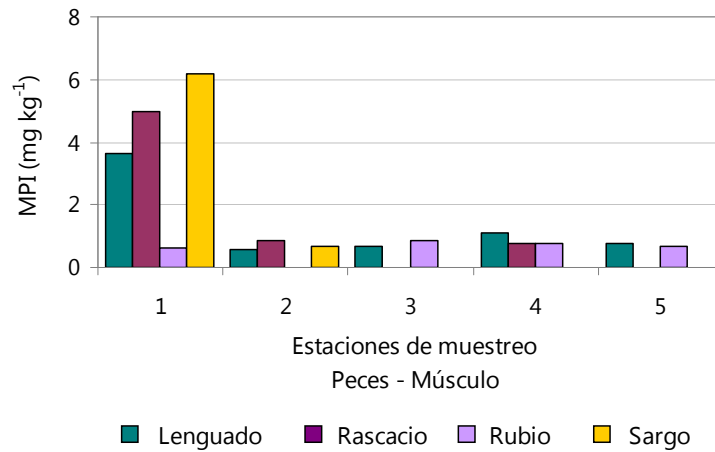


Figura IV.B.36. Índices de contaminación metálica media para músculo de peces

Con objeto de poder seguir estimando y evaluando el impacto de las fuentes de contaminación antropogénicas sobre los sedimentos de la zona estudiada y comparar entre sí los distintos puntos de muestreo, a continuación se analizan otros indicadores de contaminación utilizados con frecuencia en geoquímica. Estos parámetros se basan en comparaciones con datos de referencia o de fondo, como los valores medios de rocas sedimentarias continentales (Tabla IV.B.24) o la abundancia en la corteza terrestre [Turekian y Wedepohl, 1961; Wedepohl, 1995; Christophoridis y col., 2009].

➤ Factor de enriquecimiento (EF: Enrichment factor)

$$EF = \frac{M_x \cdot Fe_b}{M_b \cdot Fe_x};$$

donde M_x y Fe_x son las concentraciones de metal y Fe en la muestra, y M_b y Fe_b representan los niveles de fondo para el metal en cuestión y Fe en esquistos, respectivamente. El hierro o el aluminio se emplean como elementos de normalización para minimizar las posibles variaciones causadas por la heterogeneidad existente en los sedimentos. Por ello, estos elementos deben presentar concentraciones relativamente elevadas en el ecosistema de estudio, lo cual asegura una variabilidad mínima [Abraham y Parker, 2008; Christophoridis y col., 2009]. Así, las concentraciones totales de hierro fueron evaluadas en los sedimentos, para poder aplicar el cálculo del factor de enriquecimiento.

Tabla IV.B.24. Valores medios para los metales de estudio y Fe en rocas sedimentarias continentales (mg kg^{-1}) [Turekian y Wedepohl, 1961]

Metal	Concentración en esquistos (mg kg^{-1})
Zn	95
Cd	0,3
Pb	20
Cu	45
Fe	47.200

➤ Factor de contaminación (CF: Contamination factor)

Este índice de evaluación de la contaminación resulta una herramienta interesante y útil cuando se quiere realizar un seguimiento de una posible contaminación durante un cierto periodo de tiempo [Turekian y Wedepohl, 1961; Loska y col., 1997]. Puede calcularse mediante la siguiente expresión:

$$CF = \frac{\text{Concentración de metal en la muestra}}{\text{Nivel de fondo}}$$

➤ Índice de geoacumulación (I_{geo} : geoaccumulation index)

El índice de geoacumulación se basa en datos geoquímicos y permite evaluar las zonas según su grado de contaminación. Se calcula mediante la siguiente ecuación [Muller, 1979]:

$$I_{geo} = \log_2 \left(\frac{C_n}{1,5 \cdot B_n} \right)$$

donde C_n es la concentración media del metal y B_n es el nivel de fondo de esquistos continentales. El factor numérico 1,5 incluye las posibles variaciones de los datos debido a variaciones litológicas [Christophoridis y col., 2009; Abraham y Parker, 2008; Loska y col., 1997; Anagnostou y col., 1997].

En la Tabla IV.B.25 se explican y resumen los criterios de estos indicadores de contaminación (EF, CF e I_{geo})

Tabla IV.B.25. Criterios para evaluar la contaminación en sedimentos según los índices EF, CF e I_{geo}

EF	Estado de contaminación	CF	Estado de contaminación	I_{geo}	Estado de contaminación
>1	Presencia de fuentes antropogénicas	≥6	Muy alto	>5	Extremadamente alto
				4-5	Ato-Extremadamente Alto
				3-4	Alto
<1	Sin fuentes antropogénicas	3 ≤ CF < 6	Considerable	2-3	Moderado-Alto
		1 ≤ CF < 3	Moderado	1-2	Moderado
		<1	Bajo	0-1	No contaminado-Moderado
				<0	No contaminado

Se determinaron estos indicadores para cada metal en cada punto de muestreo, empleando la concentración media para los 4 muestreos realizados. Las Tablas IV.B.26, IV.B.27 y IV.B.28 muestran los valores experimentales de estos índices de contaminación para cada estación de muestreo. Asimismo, estos resultados se representaron gráficamente en la Figura IV.B.37, obteniéndose así una visualización más directa de los mismos.

Tabla IV.B.26. Valores de los factores de enriquecimiento (EF) calculados para cada metal en los puntos de muestreo de la Bahía de Algeciras

Puntos de muestreo	Zn	Cd	Pb	Cu
Playa de Getares	0,96	0,55	2,32	0,54
Isla Verde	1,16	1,19	2,53	0,88
Palmones	1,19	1,43	1,82	0,77
Guadarranque	1,27	0,89	2,31	0,78
Puente Mayorga	0,95	0,77	2,07	0,73

Tabla IV.B.27. Valores de los factores de contaminación (CF) calculados para cada metal en los puntos de muestreo de la Bahía de Algeciras

Puntos de muestreo	Zn	Cd	Pb	Cu
Playa de Getares	0,37	0,21	0,89	0,21
Isla Verde	0,47	0,48	1,02	0,35
Palmones	0,85	1,02	1,30	0,55
Guadarranque	0,63	0,44	1,14	0,39
Puente Mayorga	0,46	0,37	1,00	0,35

Tabla IV.B.28. Valores de los índices de geoacumulación (I_{geo}) calculados para cada metal en los puntos de muestreo de la Bahía de Algeciras

Puntos de muestreo	Zn	Cd	Pb	Cu
Playa de Getares	-2,02	-2,82	-0,75	-2,85
Isla Verde	-1,69	-1,65	-0,56	-2,08
Palmones	-0,82	-0,56	-0,21	-1,46
Guadarranque	-1,25	-1,76	-0,40	-1,96
Puente Mayorga	-1,72	-2,02	-0,59	-2,09

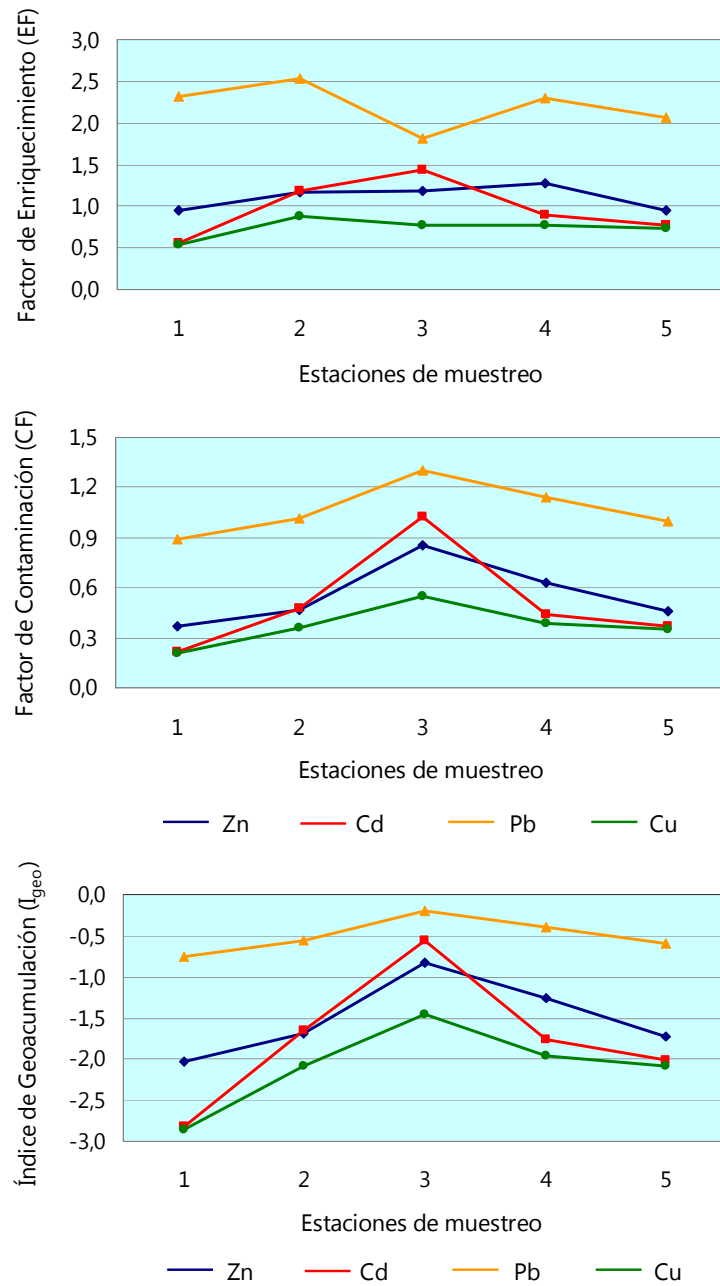


Figura IV.B.37. Índices de contaminación EF, CF e I_{geo} para los metales Zn, Cd, Pb y Cu en los puntos de muestreo de la Bahía de Algeciras

Una vez se dispone de todos los valores de los índices de contaminación, es posible clasificar los sedimentos en base a distintos grados de contaminación según los criterios vistos en la Tabla IV.B.25:

- Los datos obtenidos para el factor de enriquecimiento (EF), indican la existencia de cierta influencia antropogénica en los sedimentos de esta bahía, sobre todo de Pb (exceptuando el caso del Cu, donde todos los valores fueron inferiores a 1. Aun así, los índices más elevados se obtuvieron en Isla Verde, Palmones y Guadarranque). El Zn y Cd presenta valores inferiores a 1 en los puntos de Playa de Getares y Puente Mayorga, además de Guadarranque para el Cd. En general, Palmones, Guadarranque y Puente Mayorga reflejan la presencia de fuentes antropogénicas en sus sedimentos, las cuales pueden proceder de la empresa Acerinox y la Refinería Cepsa, entre otras. El Pb presentó los valores más elevados de estos índices, mostrando ser el metal más contaminante en las muestras de sedimento, sobre todo el Isla Verde, Guadarranque y Playa de Getares, con gran influencia urbana y de tráfico marítimo principalmente.

- Respecto al factor de contaminación (CF), pueden considerarse moderadamente contaminados ($1 \leq CF < 3$) todos los puntos para el caso del Pb (excepto la Playa de Getares), además de Palmones que presenta cierta contaminación moderada-baja por Cd. El resto de los puntos de muestreo, y en lo referente a los metales pesados Zn y Cu, presentan contaminación baja (< 1).

- En el caso del índice de geoacumulación (I_{geo}) los resultados son algo menos restrictivos, clasificándose todos los sedimentos como no contaminados (al ser todos los valores negativos). No obstante, puede observarse que los valores mayores (mayor contaminación) se obtuvieron en el caso del Pb, sobre todo en Palmones, al igual que para el resto de metales. Estos resultados están totalmente en consonancia con los obtenidos mediante el resto de los índices estudiados en este apartado, excepto para el factor de enriquecimiento, donde el nivel de Fe puede moderar el impacto de su concentración en el valor del índice.

Se puede concluir que los sedimentos de Algeciras analizados en este estudio se encontraron poco o muy poco contaminados en la mayoría de los casos (sobre todo para Cu y Zn, aunque algo más para este último metal). La contaminación más acusada fue debida al Pb en casi todos los puntos de muestreo, así como al Cd en los puntos más cercanos a actividades industriales (principalmente Palmones y Guadarranque) y en Isla Verde.

Aparte del estudio sobre los sedimentos, se procedió también al estudio de la tendencia o afinidad de las especies marinas por acumular en su organismo metales contaminantes presentes en las aguas. Estos estudios de bioacumulación pueden

ofrecer información útil en relación a la biodisponibilidad de compuestos químicos en los ecosistemas marinos [van Gestel y van Brummelen, 1996; Martín-Díaz y col., 2006]. Con el fin de poder evaluar esta bioacumulación de metales por parte de las especies, se evaluó el factor de concentración (Concentration Factor, CF) [Foster, 1976] (también denominado de bioconcentración [DeForest y col., 2007]) para un determinado metal, que se define como la relación existente entre la concentración de dicho metal en un organismo y su concentración en cualquier compartimento del ecosistema en el que se encuentre, por ejemplo, en la fracción total disuelta en agua de mar [Morel, 1983] o en la fase intercambiable en sedimentos marinos [Luoma y Bryan, 1978]. Se considera un indicador muy apropiado para comparar niveles de contaminación entre puntos distintos [Conti y col., 2002], así como para estudiar la evolución de la contaminación con el tiempo.

A continuación se muestran los factores de concentración representados gráficamente en las Figuras IV.B.38, IV.B.39, IV.B.40 y IV.B.41, expresados como $\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido/ $\mu\text{g L}^{-1}$ de agua. Para dichas representaciones se ha diferenciado entre las especies bentónicas (lenguado) y las demersales (rascacio, rubio y sargo), dado que de estas últimas especies había menos ejemplares de cada una. Al igual que en el caso del índice MPI en aguas, se tomaron como valores muy pequeños para las muestras que no contuvieron metal, la concentración del límite de detección.

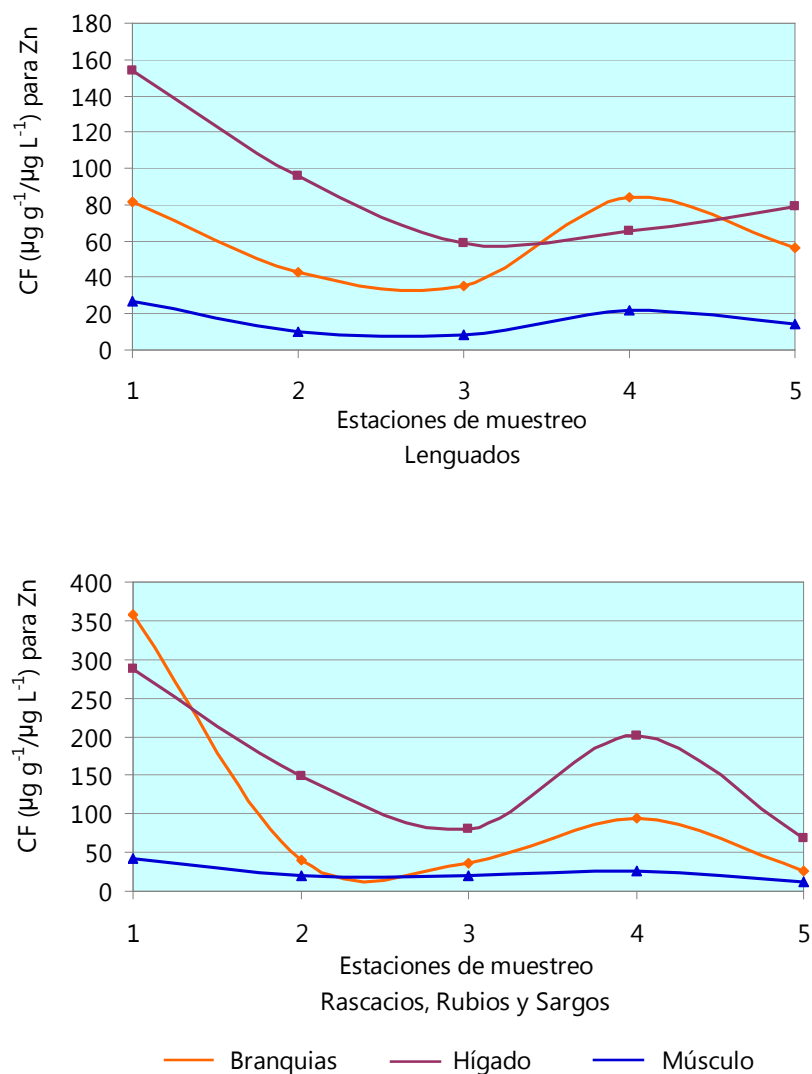


Figura IV.B.38. Factores de concentración (CF) para Zn en lenguados, rascacios, rubios y sargos en los puntos de muestreo de la Bahía de Algeciras

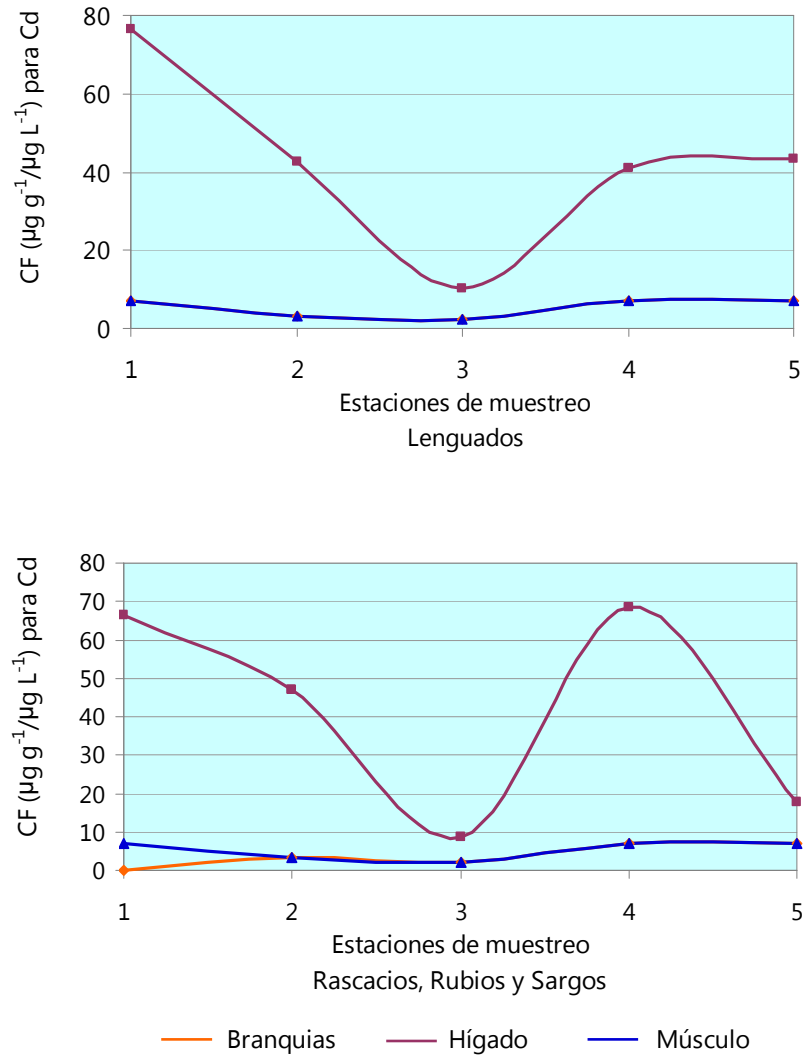


Figura IV.B.39. Factores de concentración (CF) para Cd en lenguados, rascacios, rubios y sargos en los puntos de muestreo de la Bahía de Algeciras

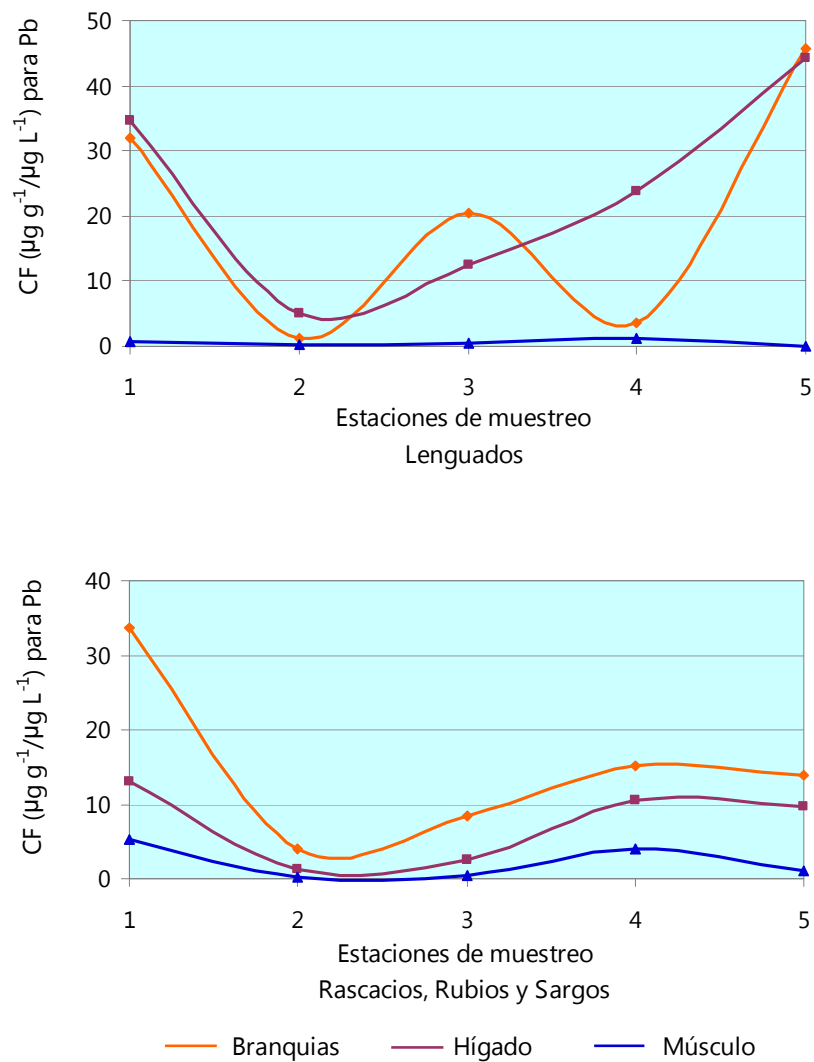


Figura IV.B.40. Factores de concentración (CF) para Pb en lenguados, rascacios, rubios y sargos en los puntos de muestreo de la Bahía de Algeciras

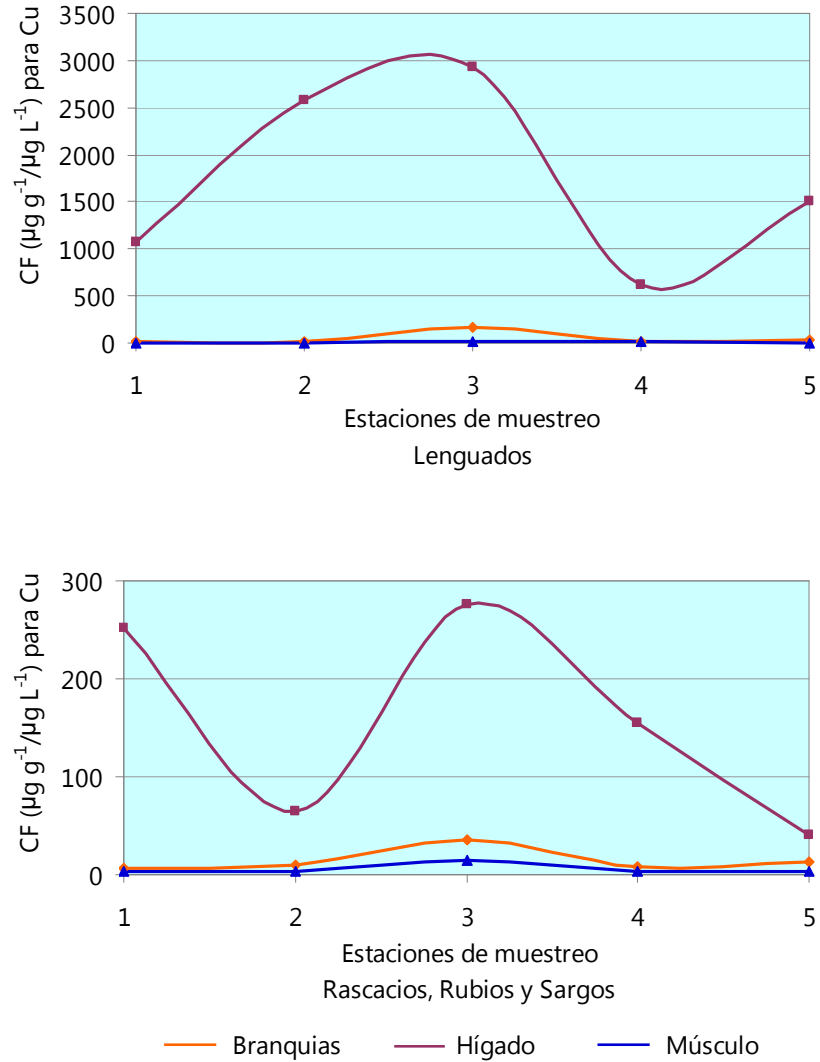


Figura IV.B.41. Factores de concentración (CF) para Cu en lenguados, rascacios, rubios y sargos en los puntos de muestreo de la Bahía de Algeciras

- A partir de los datos obtenidos para **Zn**, se puede observar que los factores de concentración más bajos se obtienen para los tejidos de músculo. Se obtienen valores máximos tanto para el punto de Playa de Getares como Guadarranque, tanto para branquias como para tejidos de hígado de todas las especies estudiadas.

- Para el **Cd**, hay que indicar que los valores máximos se obtuvieron para el hígado, siendo los tejidos de branquias y músculo mucho menos representativos. El punto de Playa de Getares mostró el valor más alto para la especie de lenguado, seguidos de los puntos P2, P4 y P5 (con valores similares de CF). Sin embargo, para el resto de las especies (rascacio, rubio y sargo) se encontraron dos valores máximos en los puntos P1 y P4.

- Para el **Pb**, los mayores valores para el factor de bioconcentración en lenguado se obtuvieron en hígado en Playa de Getares y Puente Mayorga, y en branquias para los mismos puntos, seguido de Palmones. Además, en Guadarranque se obtuvo también una mayor concentración en el hígado de lenguado (aunque más baja que la de los puntos 1 y 5). Por otro lado, Isla Verde presentó valores similares en hígado y branquias. En cambio, los valores de acumulación en músculo fueron muy bajos en todos los puntos, por ser el Pb no detectable en músculo de lenguados. Para el resto de las especies (rascacios, rubios y sargos), las curvas para el CF siguieron la misma tendencia en branquias, hígado y músculo (de mayor a menor bioconcentración), presentado sus máximos en el punto de Playa de Getares y Guadarranque. Para estas 3 especies las branquias fueron el órgano con mayor concentración de Pb para todos los puntos de muestreo.

- Respecto al **Cu**, se observa un destacable máximo de bioconcentración en hígado de lenguados, con valores elevados en Isla Verde y Palmones (ceranos al valor de 3.000). Para el resto de las especies, los máximos se obtuvieron en los puntos de Playa de Getares y Palmones, pero los valores fueron mucho menores. Para el Cu, el hígado de la especie de lenguado resultó ser el tejido con mayor bioconcentración frente a la exposición de este metal pesado, siendo muy poco útiles las branquias y los músculos (similares entre sí) para estudios de contaminación en especies.

IV.B.6.2. Comparación de las concentraciones metálicas encontradas en la Bahía de Algeciras con valores de referencia

IV.B.6.2.1. Comparación de resultados en muestras de agua con valores de referencia

A continuación se realiza una comparación de los contenidos metálicos obtenidos en este estudio con ciertos valores de fondo, naturales y valores guía en agua de mar encontrados en la bibliografía, para poder valorar el grado de contaminación de las aguas de esta bahía. En la Tabla IV.B.29 se muestran todos los valores de fondo y concentraciones naturales de Zn, Cd, Pb y Cu descritos para agua de mar. Asimismo, se recogen los niveles de referencia para evaluar el impacto sobre los ecosistemas acuáticos propuestas por la NOAA, denominadas concentraciones CMC y CCC, las cuales están referidas al contenido metálico disuelto. Por último, se incluyen los valores imperativos legislados por la Junta de Andalucía (Orden de 14 de febrero de 1997, BOJA núm. 27, 4 de marzo 1997) para la calidad de las aguas litorales andaluzas, referidos al contenido metálico total en agua de mar, donde las aguas de la Bahía de Algeciras pertenecen a la categoría de *aguas normales*. A continuación, se definen los siguientes términos de interés:

- Valor de fondo ("background"): se define como la concentración o contenido natural (sin intervención humana) de una determinada sustancia en el medio acuático. Suelen referirse a valores de concentración total.
- CMC (Criterio de Máxima Concentración): se define este valor como la estimación de la máxima concentración de una sustancia en el agua a la cual puede ser expuesta una comunidad acuática "puntualmente" sin que se produzca ningún efecto perjudicial o no recomendable.
- CCC (Criterio de Concentración Continua): se entiende como la estimación de la concentración máxima de una sustancia a la cual puede ser expuesta una comunidad acuática indefinidamente sin que produzca ningún tipo de efecto perjudicial o no recomendable.

Tabla IV.B.29. Valores de fondo, naturales y valores guía de concentración total y disuelta de metales para agua de mar ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Metal	Valores de fondo [Förstner y Wittman, 1983] ⁽¹⁾	Concentración natural [Azcue, 1993] ⁽¹⁾	Criterio NOAA-EPA de calidad de aguas [USEPA 2002] ⁽²⁾		Objetivos de Calidad de las aguas (BOJA núm. 27 de 04/03/1997) ⁽¹⁾	
			CMC ⁽³⁾	CCC ⁽⁴⁾	Clasificación aguas	Valores imperativos
Zn	0,01	<0,6	90	81	Limitadas	80
					Normales	60
Cd	0,01	<0,025	40	8,8	Limitadas	5
					Normales	2,5
Pb	0,005-0,015	<0,02	210	8,1	Limitadas	20
					Normales	10
Cu	0,04-0,1	0,01	4,8	3,1	Limitadas	40
					Normales	20

⁽¹⁾ Concentración de metal total

⁽²⁾ Concentración de metal disuelto

⁽³⁾ CMC (Criterio de Máxima Concentración): máxima concentración de exposición puntual sin efectos perjudiciales para la comunidad acuática

⁽⁴⁾ CCC (Criterio de Concentración Continua): máxima concentración de exposición indefinida sin efectos perjudiciales para la comunidad acuática

En las Figuras IV.B.42, IV.B.43, IV.B.44 y IV.B.45, se representan las concentraciones metálicas totales medias y sus desviaciones estándar en aguas, para cada uno de los metales en todos los puntos y campañas de muestreo. Asimismo se representan los valores de fondo y niveles guía o de referencia para poder llevar a cabo las comparaciones de una forma clara y rápida.

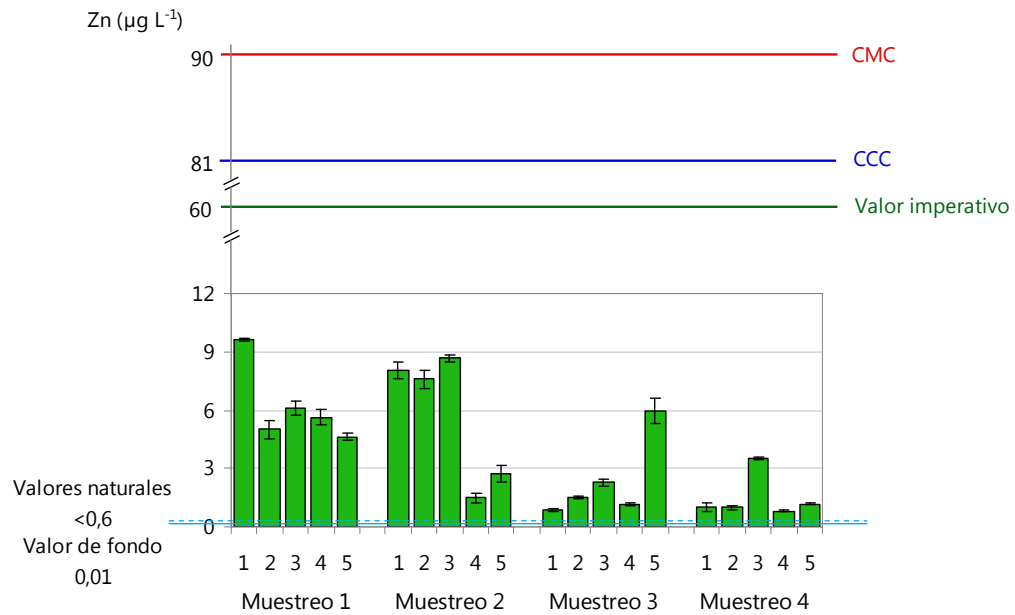


Figura IV.B.42. Comparación de concentraciones totales de Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$) en aguas con los valores de referencia CMC, CCC y valor imperativo de la Junta de Andalucía

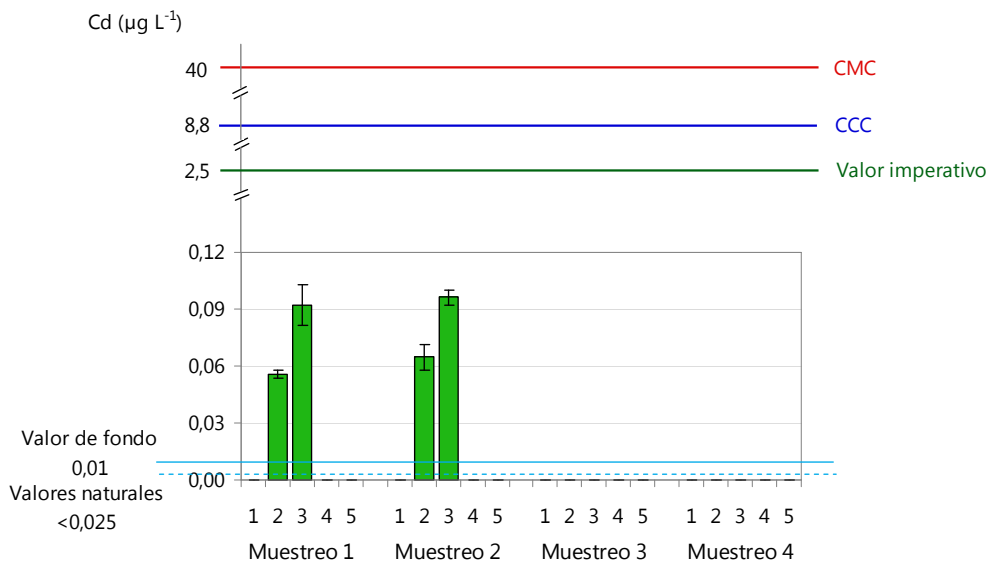


Figura IV.B.43. Comparación de concentraciones totales de Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$) en aguas con los valores de referencia CMC, CCC y valor imperativo de la Junta de Andalucía

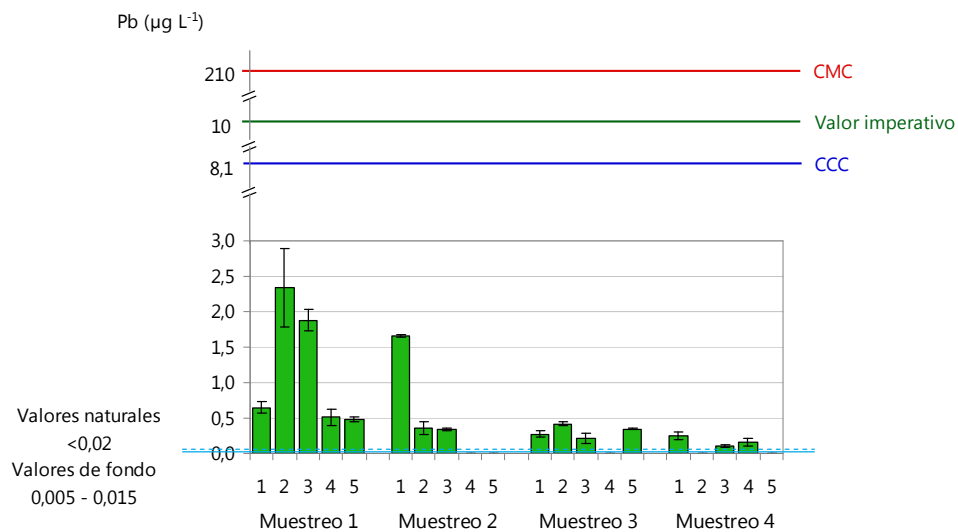


Figura IV.B.44. Comparación de concentraciones totales de Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$) en aguas con los valores de referencia CMC, CCC y valor imperativo de la Junta de Andalucía

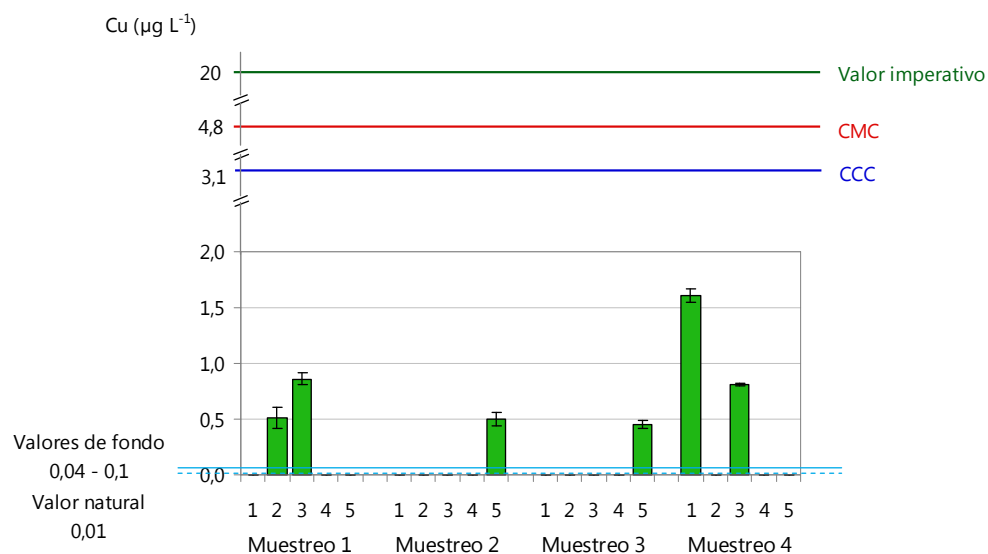


Figura IV.B.45. Comparación de concentraciones totales de Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$) en aguas con los valores de referencia CMC, CCC y valor imperativo de la Junta de Andalucía

En base a estas representaciones gráficas, se concluye que:

- En el caso del **Zn**, todos los puntos se encuentran por encima de los valores de fondo o valores naturales, lo cual refleja la presencia de aportaciones antropogénicas de este metal. Por otra parte, estos valores no alcanzan en ningún caso el valor imperativo impuesto por la Junta de Andalucía, ni los valores de CCC y CMC. Destacan los menores valores del muestreo 3 y 4 respecto a los dos primeros muestreos, exceptuando el punto de Puente Mayorga en el muestreo 3 y de Palmones en el muestreo 4 (Figura IV.B.42).

- Para el **Cd**, la mayoría de los puntos no mostraron concentraciones detectables de dicho metal, solamente pudieron determinarse los niveles existentes en los puntos correspondientes a Isla Verde y Palmones en los muestreos 1 y 2. Estos valores superan tanto los valores de fondo como los naturales, pero no sobrepasan en ningún caso el valor imperativo establecido para aguas normales según la Junta de Andalucía ni tampoco los valores CCC y CMC (Figura IV.B.43).

- Respecto al **Pb**, las concentraciones más altas se obtuvieron en el primer muestreo en los puntos de Isla Verde y Palmones, así como en la Playa de Getares en el segundo muestreo. No obstante, todos los datos, que pudieron ser determinados, sobrepasaron los niveles de fondo y naturales establecidos para Pb en agua de mar. Los valores imperativos descritos por la Junta de Andalucía y las concentraciones CCC y CMC propuestas por NOAA, no fueron sobrepasados (Figura IV.B.44).

- De la representación gráfica del **Cu** se puede concluir que la mayoría de los datos quedaron por debajo del límite de detección de la técnica. Por otra parte, los datos que sí pudieron determinarse sobrepasaron los niveles de fondo y naturales, obteniéndose la concentración máxima en el punto de Playa de Getares en el muestreo 4 (con un valor de concentración en torno a $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$). Como para el resto de los metales estudiados, tampoco se sobrepasaron los niveles imperativos, CCC y CMC (Figura IV.B.45).

Por lo general, ninguno de los valores obtenidos para los 4 metales sobrepasan los valores alarmantes (imperativos, CCC y CMC), a partir de los cuales se producirían efectos adversos sobre la vida acuática. Aún así, no se descarta la posibilidad de que la continuidad de vertidos urbanos e industriales al mar o algún tipo de contaminación puntual pueda cambiar esta situación, debido a la principal característica de bioacumulación que presentan estos contaminantes. Además, dichas concentraciones se encuentran por encima de los valores de fondo y naturales, lo cual refleja la existencia de cierta influencia de fuentes humanas. Interesa destacar que la fracción

altamente peligrosa la constituye el contenido de metal disuelto, que por lo general es inferior al contenido total, que es el que ha sido representado.

IV.B.6.2.2. Comparación de resultados en muestras de sedimento con valores de referencia

Al igual que en el apartado anterior, se han comparado los resultados experimentales obtenidos en los sedimentos de la Bahía de Algeciras con valores de referencia encontrados en la bibliografía científica. Para ello, se ha utilizado el contenido metálico total de Zn, Cd, Pb y Cu hallado en las distintas muestras de sedimento. Como referencia se han tomado concentraciones medias de éstos en esquistos (rocas sedimentarias) calculadas por Turekian y Wedepohl, las cuales constituyen una de las referencias más comunes en este tipo de estudios, y fueron utilizadas para definir y evaluar el estado de los sedimentos mediante el empleo de indicadores de contaminación en el apartado IV.B.6.1 [Turekian y Wedepohl, 1961]. Además, se han comparado los sedimentos con niveles guía para la protección de la vida acuática descritos en la bibliografía. En cuanto a la especiación metálica en sedimentos, no se encontraron valores de referencia al respecto.

En la Tabla IV.B.30 se muestran los distintos niveles guía que han sido empleados para la comparación y posterior evaluación del estado de contaminación de los sedimentos de la bahía. Como se ha comentado, además de los valores naturales en esquistos (considerados como sedimentos no contaminados), se describen los valores guía para la protección de la vida acuática (ISQG y PEL) y los niveles NS&T con efectos biológicos (ERL y ERM). Todos ellos han sido establecidos para contenidos totales y las siglas se definen a continuación:

- ISQG (Interim Sediment Quality Guidelines): Valor guía de calidad del sedimento. Concentración por debajo de la cual no se espera efectos biológicos adversos.
- PEL (Probable Effect Level): Nivel con efectos probables sobre la vida acuática.
- Niveles NS&T: son niveles de calidad establecidos en el Programa "National Status and Trends" de la National Oceanic and Atmospheric Administration (N.O.A.A.) Se distinguen los niveles ERL y ERM.
- ERL (Effects Range Low): Concentración con efectos biológicos bajos. Por debajo de este nivel, el sedimento no se considera tóxico ya que sólo presentan efectos adversos menos del 10% de los organismos estudiados.

- ERM (Effectos Range Medium): Concentración con efectos biológicos considerables. Por encima de este nivel, el sedimento se considera tóxico, ya que más del 50% de los organismos estudiados presentan efectos adversos.

Tabla IV.B.30. Valores de fondo y niveles guía de calidad para concentraciones metálicas en sedimentos marinos (mg kg⁻¹)

Metal	Valores medios en roca sedimentaria continental (esquistos) [Turekian y Wedepohl, 1961]	Niveles guía para la protección de la vida acuática [Canadian Sediment Quality Guidelines, 2002]		Niveles NS&T (NOAA) con efectos biológicos [Buchman, 2008]	
	Niveles de fondo	ISQG ⁽¹⁾	PEL ⁽²⁾	ERL ⁽³⁾	ERM ⁽⁴⁾
Zn	95	124	271	150	410
Cd	0,3	0,7	4,2	1,2	9,6
Pb	20	30,2	112	46,7	218
Cu	45	18,7	108	34	270

⁽¹⁾ ISQG: Valor guía de calidad del sedimento

⁽²⁾ PEL: Nivel con efectos probables sobre la vida acuática

⁽³⁾ ERL: Concentración con efectos biológicos bajos (efectos en menos del 10% de organismos)

⁽⁴⁾ ERM: Concentración con efectos biológicos considerables (efectos en más del 50% de organismos)

En las Figuras IV.B.46, IV.B.47, IV.B.48 y IV.B.49 se representan las concentraciones metálicas totales en sedimentos para cada uno de los metales en los 4 muestreos, junto con los valores de referencia descritos en la tabla anterior (Tabla IV.B.30).

- Las concentraciones metálicas totales de **Zn** en sedimentos se encuentran, excepto en el punto de Palmones en el muestreo 1, dentro del rango considerado como niveles de fondo. Ningún punto alcanza los niveles de referencia ISQG, PEL, ERL y ERM. No obstante, los puntos más contaminados no distan demasiado del valor ISQG (valor guía de calidad del sedimento), el cual podría sobrepasarse fácilmente (Figura IV.B.46).

- Algunas concentraciones **Cd** en sedimentos, se encuentran por encima del valor establecido como valor de fondo descrito por Turekian y Wedepohl (0,3 mg kg⁻¹), tales como Palmones en los muestreos 1, 3 y 4 e Isla Verde en el muestreo 4. Bastante cercanos se encuentran los contenidos en los puntos de Guadarranque y Puente

Mayorga en el muestro 4 e Isla Verde en el muestreo 3. No obstante, no llegan a alcanzarse en ningún caso los niveles guía que puedan causar efectos adversos sobre la vida acuática. (Figura IV.B.47).

- Para **Pb**, numerosos valores de concentración total se encuentran por encima de los valores naturales encontrados en esquistos, siendo los datos más bajos los correspondientes a primavera de 2008 (donde no superan este valor, excepto Palmones). Los puntos más contaminados se encuentran muy cercanos al valor de ISQG, alcanzándose este valor en el caso de Palmones en el primer muestreo. No obstante, ningún punto sobrepasó el umbral de los niveles PEL, ERL y ERM (Figura IV.B.48).

- En el caso del **Cu**, los valores guía de calidad del sedimento (ISQG) y el valor ERL son inferiores a los valores medios naturales encontrados en rocas sedimentarias. Algunos puntos sobrepasan el dato ISQG, en los muestreos 3 y 4. En la primavera de 2008 (muestreo 2) se observan los valores más bajos en relación a los restantes muestreos, aunque Palmones y Guadarranque se encuentran próximos al valor guía. Por otra parte, las concentraciones registradas en Palmones (muestreo 1, 3 y 4) se encuentran próximas al valor ERL, no superándose éste en ningún caso.

Por lo general, se puede estimar que los metales Zn, Cd, Pb y Cu se encuentran en muchos casos por encima del nivel de fondo y muy cercanos al valor ISQG (como en Zn y Cd), llegando incluso a superar este valor (en Pb y, sobre todo, en Cu). En el caso del Cu, no llega a sobrepasarse el valor ERL, por lo cual tampoco se esperan efectos biológicos a causa del nivel metálico de Cu en los sedimentos. Además, en el caso de sobrepasar este valor, los estudios de especiación de este metal en sedimentos reflejaron que la mayor parte de éste se encontraba en la fase residual, lo cual se traduciría en un bajo grado de biodisponibilidad o riesgo mínimo para la biota acuática. No obstante, no hay que olvidar que los sedimentos constituyen el reservorio final de los metales que se encuentran en el seno del medio acuático y, según la contaminación que siga experimentando la zona, estas concentraciones pueden variar y presentar finalmente problemas de toxicidad.

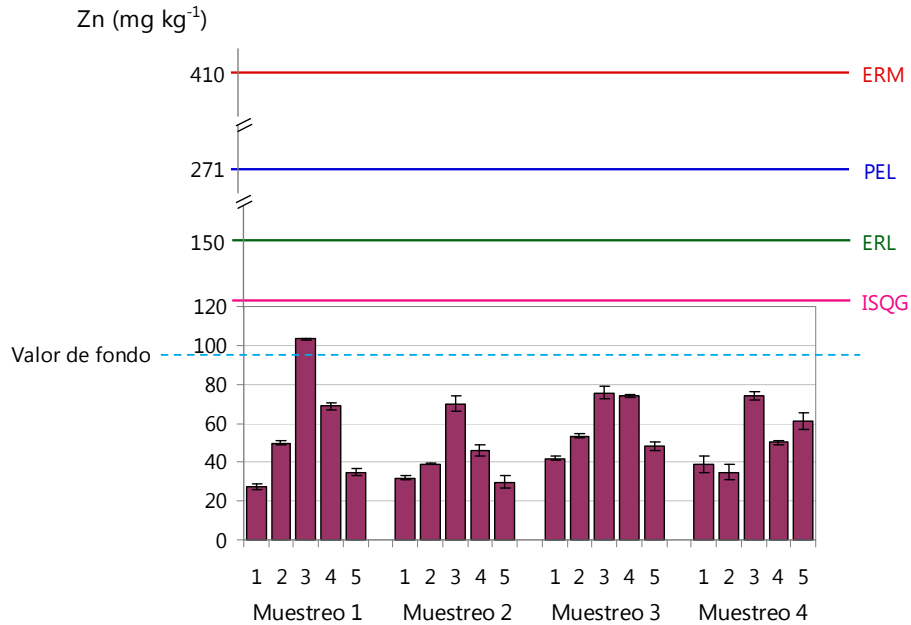


Figura IV.B.46. Comparación del contenido metálico total de Zn (mg kg^{-1}) en sedimentos con los niveles de referencia (ISQG, PEL, ERL y ERM)

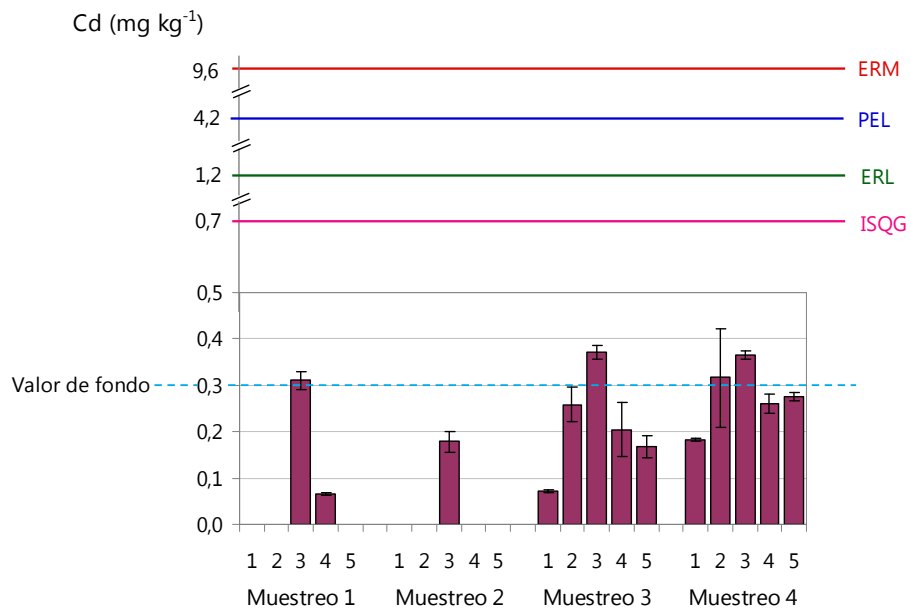


Figura IV.B.47. Comparación del contenido metálico total de Cd (mg kg^{-1}) en sedimentos con los niveles de referencia ISQG, PEL, ERL y ERM

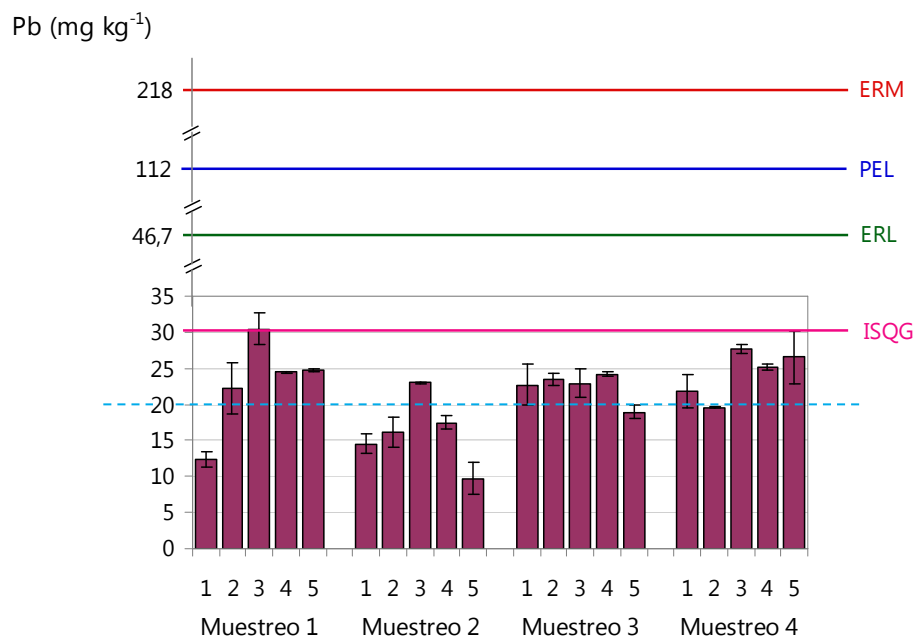


Figura IV.B.48. Comparación del contenido metálico total de Pb (mg kg^{-1}) en sedimentos con los niveles de referencia ISQG, PEL, ERL y ERM

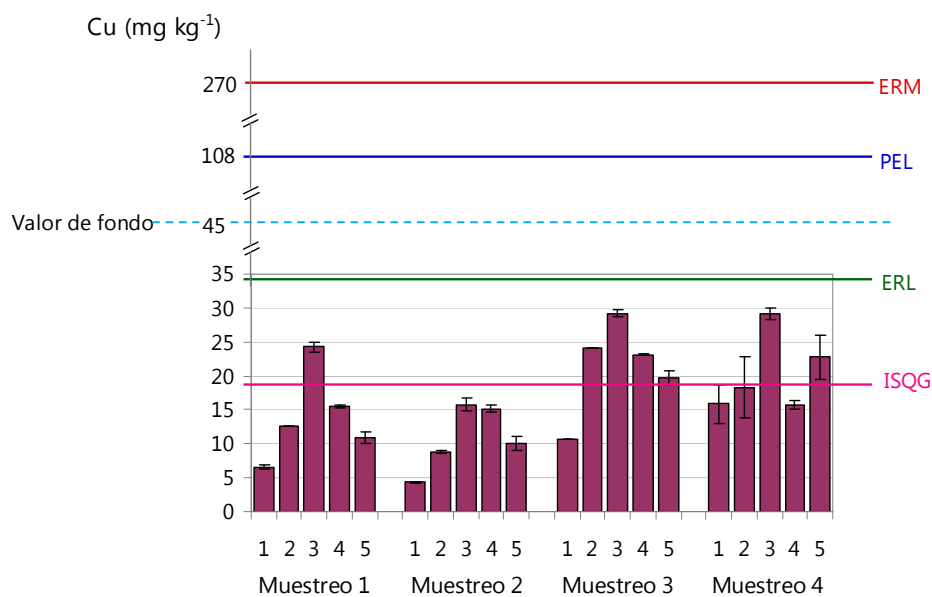


Figura IV.B.49. Comparación del contenido metálico total de Cu (mg kg^{-1}) en sedimentos con los niveles de referencia ISQG, PEL, ERL y ERM

En 2009, Choueri y col. establecieron niveles de calidad de sedimentos específicos para zonas en el Norte y Sur del litoral Atlántico. Las áreas de estudio fueron estuarios y puertos en el Sudeste de Brasil y Golfo de Cádiz (entre las que se seleccionaron la Ría de Huelva, Bahía de Cádiz y Bahía de Algeciras). Estos valores fueron determinados a partir de determinaciones de parámetros físico-químicos y ecotoxicológicos, además de estudios sobre la comunidad bentónica. Estos niveles de calidad son específicos de cada zona, diferentes y más restrictivos que los nacionales e internacionales utilizados frecuentemente. Estos autores confirmaron que este tipo de estudios tienen en cuenta las particularidades medioambientales locales de cada zona, característica no abordada por los otros niveles generales, así como resaltaron la importancia de utilizar estos niveles junto con los niveles guía de calidad nacionales para una evaluación y caracterización más completa sobre contaminación en sedimentos y materiales dragados [Choueri y col., 2009].

En la Tabla IV.B.31 se muestran los niveles guía sobre calidad de sedimentos en el Golfo de Cádiz para Zn, Cd, Pb y Cu (aunque otros metales como Co, Ni y V también fueron incluidos en el estudio de estos autores). Como se observa en la tabla, estos niveles se clasifican en tres grupos: no contaminados, moderadamente y altamente contaminados.

Tabla IV.B.31. Niveles guía específicos de calidad para metales en sedimentos del Golfo de Cádiz (mg kg^{-1} de peso seco) [Choueri y col., 2009]

Metal	Niveles guía específicos de calidad en sedimentos		
	No contaminado	Moderadamente contaminado	Altamente contaminado
Zn	$\leq 138,0$	138,0-360,0	$\geq 360,0$
Cd	$\leq 0,65$	0,65-1,20	$\geq 1,20$
Pb	$\leq 21,6$	21,6-99,2	$\geq 99,2$
Cu	$\leq 20,8$	20,8-169,0	$\geq 169,0$

Estos valores han sido representados gráficamente en la Figura IV.B.50, para poder comparar y determinar cuáles sobrepasan los límites específicos establecidos. Así, se ha representado con una línea verde el valor por debajo del cual se considera que los sedimentos no van a presentar contaminación (No Contaminados, NC) y una línea de color rojo muestra el valor por encima del cual los sedimentos se consideran potencialmente tóxicos (Altamente Contaminados, AC). Cualquier valor existente dentro de este intervalo entre el valor máximo y mínimo, establece que el sedimento se encuentra moderadamente contaminado (MC), donde las respuestas no son biológicamente predecibles, pero no se descartan posibles episodios de contaminación.

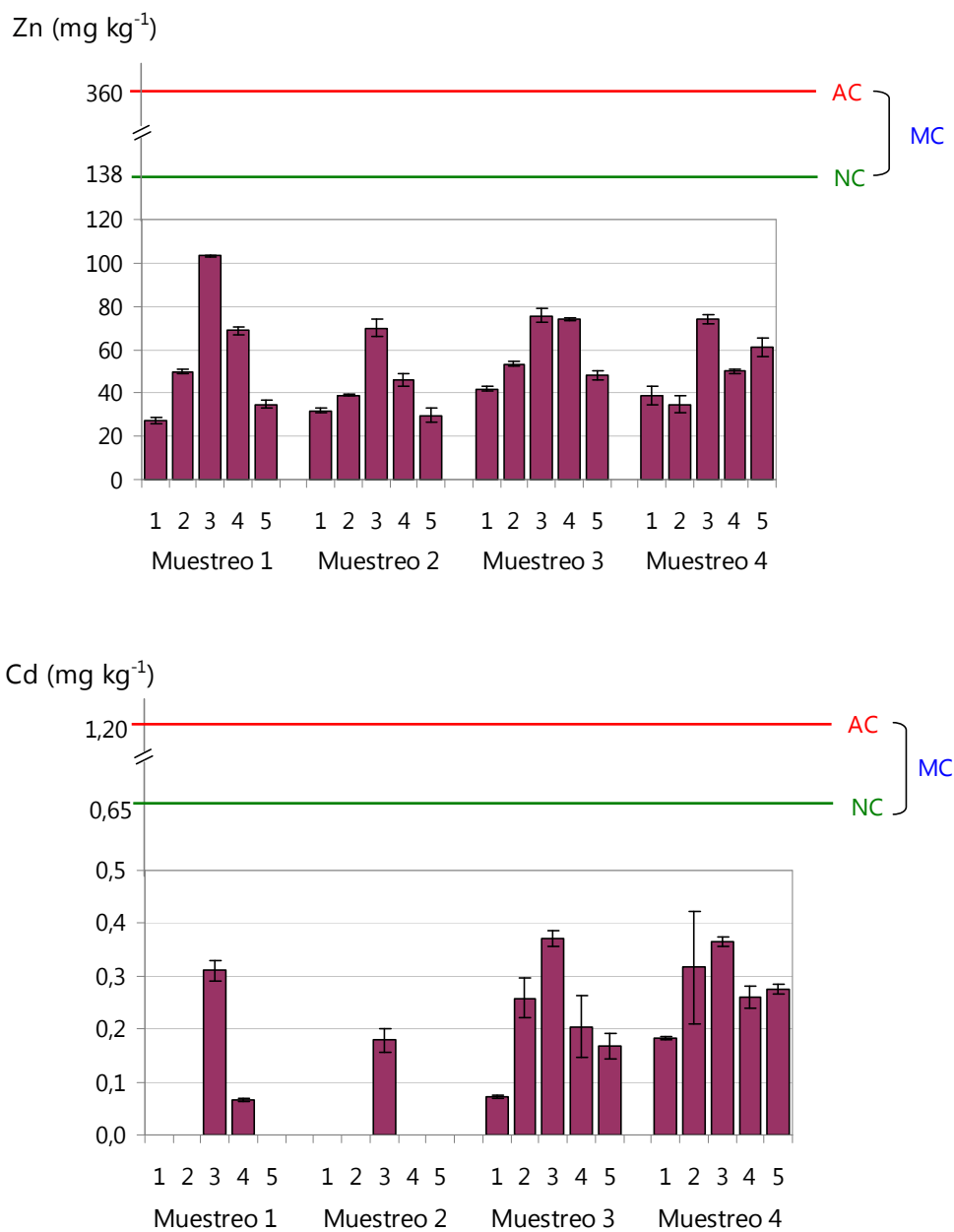


Figura IV.B.50. Comparación del contenido metálico total en sedimentos con los niveles guía específicos de calidad (NC, MC y AC), establecidos en el Golfo de Cádiz para Zn y Cd

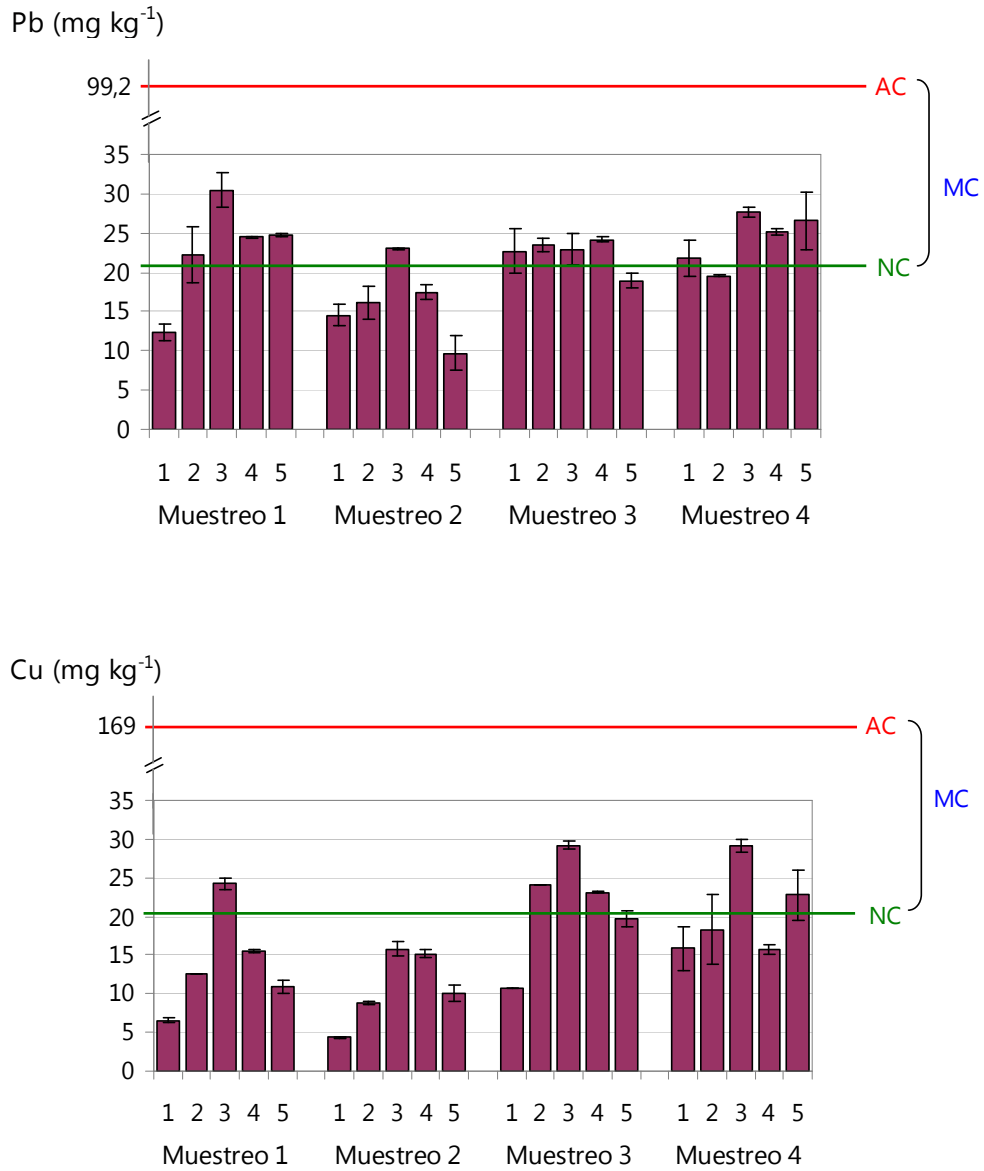


Figura IV.B.50 (cont.). Comparación del contenido metálico total en sedimentos con los niveles guía específicos de calidad (NC, MC y AC), establecidos en el Golfo de Cádiz para Pb y Cu

Comparando los valores de la concentración metálica total obtenidos en los sedimentos analizados en la zona de estudio (para todos los puntos y campañas de muestreo), con los citados niveles guía específicos acerca de la calidad en sedimentos, se observó que tanto para Zn como Cd, todos los resultados quedaron por debajo del límite inferior, por lo que estos sedimentos no presentaron contaminación por estos metales pesados. En el caso del Pb, numerosos puntos sobrepasaron el límite NC de no contaminación, presentando una contaminación moderada. En el muestreo 2 los valores fueron inferiores al valor NC, excepto en el punto P3 de Palmones, que seguía presentando una concentración superior al nivel NC. Lo mismo ocurrió para el caso del Cu, donde puntos como Isla Verde (P2) (muestreos 3 y 4), Palmones (P3) (muestreos 1, 3 y 4), Guadarranque (P4) (muestreo 3) y Puente Mayorga (P5) (muestreos 3 y 4) sobrepasaron el límite inferior NC y se clasificaron como sedimentos moderadamente contaminados. Sin embargo, ningún punto sobrepasó dichos límites en el caso del muestreo realizado en primavera de 2008, donde se obtuvieron los valores más bajos.

Por tanto, aunque los niveles guía específicos descritos por Choueri y col. son más restrictivos, para Zn y Cd se obtuvieron las mismas conclusiones que utilizando los niveles usuales (ISQG, PEL, ERL y ERM). Los sedimentos no presentan contaminación por estos metales. Por otro lado, el Pb pasa a considerarse como moderadamente contaminado y el Cu también. Estos nuevos resultados vuelven a estar en concordancia con los anteriores (donde se superó el nivel ISQG en algunos casos, si bien quedaron por debajo de la concentración ERL).

IV.B.6.2.3. Comparación de resultados en muestras de peces con valores de referencia

Para el estudio comparativo de las concentraciones de los metales en las muestras de peces no existen valores de fondo ni niveles guía clasificados por tejidos. Solo se disponen de parámetros que hacen alusión a la especie completa, que suelen hacer referencia a la "carne" (músculo).

En la Tabla IV.B.32 se muestran los valores legales vigentes en la Comunidad Europea, valores de tolerancia establecidos por la FAO/OMS (Food and Agricultural Organization/Organización Mundial de la Salud), niveles de calidad en países como Turquía, valores según el Código Alimentario Argentino (CAA) y, por último, niveles según el código australiano establecido por la ANZFA (Australia and New Zealand Food Authority), para asegurar la salud de los consumidores.

Tabla IV.B.32. Valores guía para el contenido de metales en peces (mg kg⁻¹ peso húmedo)

Metal	Contenido máximo (CE)⁽¹⁾	Niveles tolerancia en peces (FAO/WHO, 1989; ITS, 2000)⁽²⁾	Niveles guía en Turquía (1988)⁽²⁾	Niveles según Código Alimentario Argentino (CAA)⁽³⁾	Código australiano (ANZFA)
Zn		50	50		
Cd	0,05 ^a 0,10 ^b 0,30 ^c	0,1	0,1	1,0	0,2
Pb	0,3	0,5	1	2	0,5
Cu			20		10

⁽¹⁾ Reglamento CE nº 1881/2006 [CE, 2006]

^a clase 1: carne de pescado excluidas las especies numeradas en clase 2 y clase 3

^b clase 2: carne de las siguientes especies: anchoa, bonito, mojarra, anguila, lisa, jurel, luvaro, sardina, atún, acedía

^c clase 3: carne de pez espada

⁽²⁾ [Demirak y col., 2006]

⁽³⁾ CAA (Código Alimentario Argentino): Límites máximos de tolerancia de contaminantes inorgánicos en pescados y productos de la pesca

Estos datos de referencia encontrados en la bibliografía suelen expresarse en unidades de mg de metal/kg de peso húmedo y principalmente comparan datos de contenido en músculo. Dado que en este estudio se obtuvieron los resultados del contenido metálico referidos a kg de tejido por peso seco, se realizó una transformación de los valores mediante un factor que incluye el porcentaje medio de humedad del músculo: 80% en músculo [Lozada-Zarate y col., 2007; Vicente-Martorell, 2010]. A continuación se establecen comparaciones para todos los metales (Tabla IV.B.33, IV.B.34, IV.B.35 y IV.B.36), sin tener en cuenta las campañas de muestreo, en aquellos casos en los que se dispone de valores guía en peces para poder realizar estudios de comparación. De esta forma, se indican los puntos de muestreo cuyos valores medios superan los distintos valores de referencia.

Tabla IV.B.33. Puntos de muestreo que superan los valores de referencia para Zn en músculo de los distintos peces analizados de la Bahía de Algeciras

Pez	Niveles tolerancia en peces (FAO/WHO,ITS)	Niveles guía en Turquía
L	1, 2, 3, 4, 5	1, 2, 3, 4, 5
Ra	1, 2, 4	1, 2, 4
Ru	3, 4, 5	3, 4, 5
S	1, 2	1, 2

L: Lenguado; Ra: Rascacio; Ru: Rubio; S: Sargo

Tabla IV.B.34. Puntos de muestreo que superan los valores de referencia para Cd en músculo de los distintos peces analizados de la Bahía de Algeciras

Pez	Contenido máximo (CE)	Niveles tolerancia en peces (FAO/WHO,ITS)	Niveles guía en Turquía	Código Alimentario Argentino (CAA)	Código australiano (ANZFA)
L	4	4	4	-	4
Ra	-	-	-	-	-
Ru	3	3	3	3	3
S	-	-	-	-	-

L: Lenguado; Ra: Rascacio; Ru: Rubio; S: Sargo

Tabla IV.B.35. Puntos de muestreo que superan los valores de referencia para Pb en músculo de los distintos peces analizados de la Bahía de Algeciras

Pez	Contenido máximo (CE)	Niveles tolerancia en peces (FAO/WHO,ITS)	Niveles guía en Turquía	Código Alimentario Argentino (CAA)	Código australiano (ANZFA)
L	5	1, 3, 5	1,5	-	1, 3, 5
Ra	1,4	1,4	1, 4	1, 4	1,4
Ru	3,4	3,4	3, 4	3, 4	3,4
S	1	1	1	1	1

L: Lenguado; Ra: Rascacio; Ru: Rubio; S: Sargo

Tabla IV.B.36. Puntos de muestreo que superan los valores de referencia para Cu en músculo de los distintos peces analizados en la Bahía de Algeciras

Pez	Niveles guía en Turquía	Código australiano (ANZFA)
L	4	3, 4, 5
Ra	-	2
Ru	-	3
RaS	-	-

L: Lenguado; Ra: Rascacio; Ru: Rubio; S: Sargo

De estas cuatro tablas comparativas, se pudieron extraer las siguientes conclusiones:

- Para el **Zn**, tanto el valor de tolerancia en peces establecido por la OMS como nivel guía en Turquía presentan un valor de 50 mg kg^{-1} (referidos a peso húmedo). Los tejidos de músculo de lenguado superaron dicho valor en todos los puntos de muestreo, siendo también superado en casi todas las estaciones para rascacios y rubios. En la especie de sargo se superaron los valores límite en el punto de Getares e Isla Verde.

- En el caso del **Cd**, se superaron los valores determinados por la OMS y Turquía en los puntos 4 para lenguado y 3 para rubio.

- El **Pb** superó en diversos puntos el contenido máximo (para lenguados en el P5, para rascacio en el P1 y 4, para rubio en el P3 y P4 y para sargo en el P1). Los niveles mayores de la FAO y Turquía incluyen también los resultados del P5 para lenguados.

- Para el **Cu** se superaron los niveles para lenguado en el punto P4 (Guadarranque) según los niveles de Turquía y además en P3 (Palmones) y P5 (Puente Mayorga) según los niveles ANZFA.

IV.B.7. Conclusiones

Se han analizado los contenidos metálicos de Zn, Cd, Pb y Cu en muestras de agua, sedimentos y peces procedentes de la Bahía de Algeciras, donde se encuentran ubicadas numerosas industrias y un denso tráfico marítimo, con el fin de evaluar una posible contaminación derivada de estas fuentes.

Para dicho estudio, primero se efectuó uno previo mediante la selección de 17 puntos de muestreo, de los cuales fueron extraídas muestras de sedimento a las que se sometieron al análisis del contenido metálico total y a la determinación de la fracción más biodisponible dentro del sedimento. Finalmente, y basándonos en estos resultados, se seleccionaron 5 puntos de muestreo de interés estratégicamente distribuidos a lo largo de la Bahía, con el objetivo de evaluar y correlacionar los resultados obtenidos a lo largo de 4 campañas de muestreo (estacionalmente repartidas) donde se analizaron a fondo muestras de agua, sedimentos y peces.

En las muestras de agua se analizó el contenido metálico total para los 4 metales seleccionados, así como la fracción disuelta y la particulada, con el fin de establecer la biodisponibilidad y peligrosidad de los mismos en el seno del medio acuático. Dicho contenido se ordenó de mayor a menor concentración de manera que: $[Zn] > [Pb] > [Cu] > [Cd]$. Entre los puntos que mostraron concentraciones de metal detectables, se obtuvo el siguiente orden en relación a su mayor o menor biodisponibilidad: $Cd > Zn \approx Cu \approx Pb$, donde el Cd presentó un mayor porcentaje en la fase disuelta. Esta tendencia pudo confirmarse mediante el cálculo de los coeficientes de reparto para cada metal. No obstante, aunque el Cd se presentó como el metal más potencialmente peligroso, el riesgo que entraña en el ecosistema no es tal debido a sus bajas concentraciones (por debajo del límite de detección en la mayoría de los puntos de muestreo). Se compararon las aguas estudiadas con concentraciones metálicas encontradas en zonas no contaminadas ni industrializadas (como es el caso de la Bahía de Cádiz). Los valores fueron inferiores a éstos, por lo que cabe pensar que los vertidos ricos en estos metales pesados no son muy elevados en la bahía y/o que el movimiento de las aguas de la zona favorece su dispersión y evita su concentración/contaminación. Además, tras comparar todos estos resultados con valores de fondo y niveles guía encontrados en la bibliografía, se encontró que, por lo general, ninguno de los valores obtenidos para los 4 metales sobrepasan los valores alarmantes (imperativos, CCC y CMC), a partir de los cuales se producirían efectos adversos sobre la vida acuática. Aún así, no se descarta la posibilidad de que la continuidad de vertidos urbanos e industriales al mar o algún tipo de contaminación puntual pueda cambiar esta situación, debido a la principal característica de bioacumulación que presentan estos contaminantes. Además, dichas concentraciones

se encuentran por encima de los valores de fondo y naturales, lo cual refleja la existencia de cierta influencia de fuentes humanas. Interesa destacar que la fracción altamente peligrosa la constituye el contenido de metal disuelto, que por lo general es inferior al contenido total, que es el que ha sido representado.

En el caso de los sedimentos, las concentraciones totales pudieron ordenarse como $[Zn] > [Pb] \approx [Cu] > [Cd]$. Además se realizó un estudio de especiación en sedimentos, para obtener información acerca de la biodisponibilidad de cada metal: $Cd > Zn > Cu \approx Pb$. Así se encontró que en cuanto a la disponibilidad de estos metales el Cd era el más disponible, con mayor tendencia a pasar del sedimento a la columna de agua. Este resultado no fue especialmente alarmante debido a su baja concentración. Además, la comparación con los niveles de fondo y guía mostraron que los metales Zn, Cd, Pb y Cu se encuentran en muchos casos por encima del nivel de fondo y muy cercanos al valor ISQG (como en Zn y Cd), llegando incluso a superar este valor (en Pb y, sobre todo, en Cu). Sin embargo, en ningún caso llega a sobrepasarse el valor ERL, por lo que no se esperan episodios graves de toxicidad a causa del nivel metálico de Cu en los sedimentos. Además, en el caso de sobrepasar este valor, los estudios de especiación de este metal en sedimentos reflejaron que la mayor parte de éste se encontró en la fase residual, lo cual se traduciría en un bajo grado de biodisponibilidad o riesgo mínimo para la biota acuática. Hay que destacar que los valores de fondo en el caso del Cu se encuentran por encima del nivel ISQG y ERL. No obstante, no hay que olvidar que los sedimentos constituyen el reservorio final de los metales que se encuentran en el seno del medio acuático y, según la contaminación que siga experimentando la zona, estas concentraciones pueden variar y presentar finalmente problemas de toxicidad.

Por último, el efecto de esta contaminación por metales pesados fue estudiado en tejidos biológicos de 4 especies de peces bentónicas y demersales (lenguado, rascacio, rubio y sargo). El contenido metálico total promedio -unificando todas las especies y tejidos estudiados-, se ordenó de la siguiente manera: $[Zn] \geq [Cu] > Pb \geq Cd$. En cuanto a la acumulación en tejidos, los metales Zn, Cd y Cu se acumularon principalmente en hígado, mientras que el Pb también presentó una acumulación alta en tejidos de branquias (además de hígado). En lo referente a las especies estudiadas, el lenguado resultó ser la especie más afectada por la contaminación metálica respecto a las demás (con algunas excepciones). Al comparar con los valores de referencia encontrados en la bibliografía para la especie completa, se observó que muchos de las especies y tejidos superaron dichos valores. Por tanto, los peces sí presentaron contaminación por estos metales sobre todo en hígado. Debemos destacar que los valores guía en peces se refieren a concentración metálica en la carne de la especie, no a sus tejidos donde la acumulación se espera sea mayor. Aún así, hemos comparado nuestros resultados con

estos valores debido a que no se disponen de valores de referencia clasificados por tejidos.

En conclusión se puede decir que aunque las aguas y sedimentos no presentaron efectos tóxicos en el medio acuático, no ocurrió lo mismo para las muestras de peces. Esto implica que los metales existentes en las aguas y sedimentos tienden a penetrar en los organismos acuáticos, donde se bioconcentran y bioacumulan, lo cual puede entrañar un grave riesgo para la salud humana, al entrar estos en la cadena alimenticia. Además, los vertidos procedentes de las actividades industriales de la zona así como los desechos urbanos de las poblaciones colindantes y las actividades marítimas de los puertos, están continuamente afectando a este ecosistema y, los índices de contaminación aplicados a los puntos de muestreo, dan constancia de ello. Esta zona deberá seguir siendo objeto de estudio y realizar un seguimiento para poder controlar esta contaminación y, en caso que sea necesario, proponer medidas preventivas o de remediación.

Conclusiones generales

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos de la investigación llevada a cabo en esta Tesis, se pueden enumerar como principales conclusiones las que se muestran a continuación:

1. En relación al desarrollo de la metodología analítica, se realizó el estudio de la preconcentración de Pb en agua de mar. Así, se ha desarrollado un nuevo método de separación y preconcentración de plomo utilizando el reactivo 2-hidroxibenzaldehído-N-etiltiosemicarbazona (2-HBET) que actúa como transportador en la membrana líquida diseñada. Así:
 - I. Se ha demostrado la aplicabilidad del reactivo orgánico 2-hidroxibenzaldehído-N-etiltiosemicarbazona (2-HBET) como agente transportador para la extracción del plomo, mediante formación del complejo Pb(II)-2-HBET, como un sistema de membrana líquida de volumen (MLV).
 - II. Se ha estudiado el efecto del pH de la fase acuosa cargada en el proceso extractivo, encontrándose diferencias significativas en el rendimiento según el valor de pH y el tipo de reguladora utilizada. El valor óptimo para llevar a cabo el proceso se halla entre 8-8,5 usando como reguladora $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$. El complejo se destruye empleando una disolución de ácido nítrico de concentración $0,3 \text{ mol L}^{-1}$.
 - III. Se han optimizado el resto de los parámetros que influyen en la eficacia del proceso de preconcentración, así como la influencia del ión cloruro en este proceso de transporte.
 - IV. Se ha aplicado el método de membrana líquida desarrollado a la determinación de Pb(II) en una muestra real de agua de mar tomada de la Bahía de Algeciras, con resultados muy satisfactorios.

2. Se han aplicado dos moléculas sensoras fluorescentes (2-HNFT y 2-HNDP) como sensores para la determinación de Fe(III) en disolución acuoso-orgánica. La complejación de la molécula 2-HNFT con el hierro produce un aumento de la fluorescencia inicial del sensor (sensor de tipo "Off-On"), mientras que en el caso del sensor 2-HNDP se produce una atenuación de la fluorescencia inicial de éste ("On-Off"), cuando se pone en contacto con el ión Fe(III). Los resultados de esta investigación muestran el desarrollo de dos métodos sencillos, rápidos, de bajo coste y muy selectivos para la determinación del catión. Estas investigaciones pueden integrarse en el diseño de un sensor químico de fibra óptica sencillo y de bajo coste para el análisis in situ de hierro en muestras acuosas, mediante un sistema miniaturizado de extracción en fase sólida.
3. Por último, también se ha realizado un estudio integrado de impacto medioambiental en la Bahía de Algeciras, zona afectada por una intensa actividad antropogénica. Para ello, se han evaluado los niveles metálicos totales y su especiación química, en muestras de agua, sedimento, al igual que se ha estudiado la bioacumulación de los metales en peces de la zona, tomados en 5 puntos de la bahía. Los estudios realizados pueden resumirse de la siguiente manera:

Se han establecido los niveles metálicos totales de Zn, Cd, Pb y Cu presentes en las aguas y los sedimentos, así como su distribución en las distintas fracciones químicas (especiación) en ambos compartimentos medioambientales. En conclusión se puede decir que, aunque las aguas y sedimentos no presentaron efectos tóxicos en el medio acuático, no ocurrió lo mismo para las muestras de peces. Esto implica que los metales existentes en las aguas y sedimentos tienden a penetrar en los organismos acuáticos, donde se bioconcentran y bioacumulan, lo cual puede entrañar un grave riesgo para la salud humana, al entrar estos en la cadena alimenticia. Además, los vertidos procedentes de las actividades industriales de la zona así como los desechos urbanos de las poblaciones colindantes y las actividades marítimas de los puertos, están continuamente afectando a este ecosistema y, los índices de contaminación aplicados a los puntos de muestreo, dan constancia de ello. Esta zona deberá seguir siendo objeto de estudio y realizar un seguimiento para poder controlar esta contaminación y, en caso que sea necesario, proponer medidas preventivas o de remediación.

Anexos

Anexo 1. Protocolos de limpieza

Son muchas las dificultades que se presentan a la hora de estudiar la distribución y el comportamiento de elementos traza, en concreto los metales pesados en los ecosistemas acuáticos, dada la baja concentración en la que se encuentran algunos metales y la complejidad que pueden presentar algunas matrices. Cuando se trata en concreto de estudios de especiación de metales pesados en aguas, donde los niveles metálicos son menores que en sedimentos y biota, es necesario tomar singulares precauciones desde el punto de vista analítico para alcanzar resultados seguros, fiables y exactos, pues en este caso las concentraciones metálicas suelen ser muy bajas. Es por ello que se ha de prestar especial atención en evitar la contaminación de la muestra ambiental en cada una de las etapas experimentales que componen el análisis. Estas etapas comprenden la toma de muestra, el almacenamiento de la misma, la realización de una etapa de preconcentración en algunos casos y la determinación analítica final de los elementos de interés. Todos estos pasos implican una manipulación de la muestra, que puede originar cambios en su composición, debidos, por lo general, a problemas de contaminación. Por ello, hace algunas décadas se introdujeron técnicas de limpieza durante el muestreo y el tratamiento de las muestras. Patterson y Settle (1976) se percataron de que las medidas de las concentraciones ambientales de plomo eran con frecuencia erróneas debido a la contaminación de las muestras y fueron los pioneros en desarrollar los primeros protocolos de limpieza para el muestreo y manipulación de las muestras en el análisis elemental de matrices ambientales.

La introducción de este tipo de técnicas limpias, así como el desarrollo experimentado por las técnicas analíticas instrumentales, han permitido disminuir los límites de detección demostrando que las concentraciones en aguas naturales no contaminadas eran entre 10 y 1000 veces inferiores a las que habían sido determinadas con anterioridad [Creasey y Flegal, 1999].

Por estas razones, durante toda la fase experimental se aplicaron condiciones de limpieza para análisis de metales en muestras de sedimento y tejidos biológicos y condiciones de ultralimpieza para el análisis de las aguas, tales como la utilización de dobles guantes de plástico para el manejo del material y atmósferas limpias por medio de campanas de flujo laminar Clase 100 (Crumair 9005-FL, con filtro absoluto HEPA, Cruma, España) durante la manipulación de las muestras.

A continuación se detalla el procedimiento general de limpieza de material, así como el protocolo específico de limpieza seguido en la toma de muestra.

Anexo 1.1. Protocolo general de limpieza del material de laboratorio

El protocolo de limpieza de material para estos estudios centrados en elementos traza, es muy laborioso y requiere de mucho tiempo, pero se hace imprescindible al trabajar con niveles de metales excesivamente bajos. De forma general, consta de las siguientes etapas:

1. El material se lava inicialmente con agua y detergente.
2. Tras enjugarse el material con agua corriente, éste se vuelve a enjuagar con agua Milli-RO (agua purificada por ósmosis inversa, equipo Elix 3, Millipore). Posteriormente se lava con HNO_3 (2 mol L^{-1}), tanto por fuera como por dentro, empleándose pequeñas porciones de ácido que se hacen pasar por toda la superficie, repitiendo la operación al menos tres veces y, posteriormente, el ácido empleado se descarta.
3. Se enjuagó tres veces con agua Milli-RO para retirar los restos de ácido.
4. Posteriormente se procedió a sumergir el material en baño cerrado de HNO_3 para análisis (2 mol L^{-1}) durante un par de días. Este ácido se preparó utilizando agua Milli-Q (agua desionizada, equipo Milli-Q⁵⁰, Millipore) como disolvente y se renovó, al menos, una vez al mes en función de su uso.
5. Finalmente se enjuaga varias veces con agua Milli-Q y se deja secar en una campana de flujo laminar, con atmósfera limpia.

En particular, el procedimiento de limpieza del material en contacto con las muestras de agua muestreadas en la Bahía de Algeciras (Capítulo IV.B) fue idéntico al descrito, sólo que el material se dejó en el baño de HNO_3 durante una semana. Pasado

este tiempo, se enjuagó varias veces con agua Milli-Q y se almacenó en bolsas de plástico transparente hasta su utilización.

En el caso del muestreo de sedimentos y tejidos de peces, la limpieza del material empleado no fue tan rigurosa. En este caso, el material fue limpiado 3 veces con agua Milli-Q, tras lo cual se sumergió en un baño cerrado de HNO_3 para análisis (2 mol L^{-1}) durante un día. Posteriormente, se enjuagó con agua Milli-Q 3 veces.

Anexo 1.2. Procedimiento de limpieza del material usado en la toma de muestras de agua

El material utilizado en la toma de muestra de aguas comprende los tubos de recogida de muestra, los cartuchos de filtración, los filtros de nylon y los botes destinados a recoger y almacenar las muestras.

Tubos de toma de muestra

En la toma de muestra se utilizaron dos tipos de tubos: uno de teflón rígido de FEP (propileno etileno fluorinado) (6406-66 de Cole-Parmer Instrument Co. Illinois U.S.A) para la toma de muestras, y varios tubos flexibles de Tygon (6424-71 de Cole-Parmer Instrument Co. Illinois U.S.A.) (tubo C-Flex) que se unen al de teflón rígido con el fin de ayudar en el avance del agua mediante el movimiento peristáltico de la bomba. Estos tubos fueron elegidos dada su baja capacidad de adsorción de metales y su alta resistencia al ataque ácido.

El tubo de teflón fue limpiado llenándolo con 3 mol L^{-1} de HCl para análisis mediante ayuda de la bomba peristáltica, y manteniéndolo así por un periodo no inferior a seis semanas hasta el momento de la toma de muestra. Para retener el ácido en el interior del tubo se unieron los dos extremos con un pequeño trozo de tubo C-Flex. El tubo lleno de ácido se guardó en una doble bolsa opaca, para preservarlo de posibles fuentes de contaminación, hasta el momento de la toma de muestra.

Para realizar la limpieza de los tubos C-Flex, éstos se dividieron en porciones de 30 cm de longitud que se mantuvieron dentro de un baño de 3 mol L^{-1} de HCl para análisis durante una semana. Después de este tiempo se enjuagaron con agua desionizada Milli-Q dentro de una campana de flujo laminar. Una vez enjuagados se guardaron en bolsas con cierre hermético, que a su vez se almacenaron en una bolsa opaca. Estos tubos se conservaron hasta la realización de la toma de muestra.

Cartuchos de filtración

La limpieza de los cartuchos de filtración utilizados ((Whatman groundwater filter capsule, 0,45 μm 29705-92, Cole-Parmer Instrument Co. Illinois U.S.A.) se realizó en diversas etapas: en primer lugar, con ayuda de la bomba, se llenaron los cartuchos con metanol dejándose llenos durante 24 horas; para mantener los extremos unidos se empleó un pequeño trozo de tubo flexible de C-Flex. Pasado el tiempo requerido, se vació el metanol de los cartuchos y se lavaron con agua desionizada Milli-Q para retirar cualquier resto, dejándose llenos de agua durante 24 horas. Posteriormente, se les retiró el agua desionizada Milli-Q y se llenaron con HCl para análisis de concentración 0,5 mol L^{-1} , manteniéndose así durante una semana. Luego, se vaciaron de HCl y se lavaron con agua desionizada Milli-Q hasta retirar todo el resto de ácido. Es importante eliminar completamente el HCl del interior de los cartuchos, pues en el siguiente paso se utiliza HNO_3 y la mezcla de ambos ácidos puede producir una degradación del filtro. Tras dejar los cartuchos llenos de agua desionizada Milli-Q durante 24 horas, se llenaron con disolución de HNO_3 0,5 mol L^{-1} , manteniéndose de esta manera dentro de bolsas con cierre hermético, que a su vez se guardaron en el interior de una doble bolsa opaca hasta su utilización. Los ácidos utilizados en esta limpieza pudieron ser reutilizados unas 5 veces sin que se perjudicara la calidad de limpieza del material.

Filtros de nylon

Los filtros de nylon de 0,45 μm fueron utilizados para determinar la materia suspendida en las muestras de agua. Los filtros se trataron en primer lugar con agua desionizada Milli-Q y luego se sumergieron en disolución de HNO_3 para análisis de concentración 2 mol L^{-1} durante una semana. Tras este periodo, se enjuagaron de nuevo con agua Milli-Q y se secaron en estufa, a 105 $^{\circ}\text{C}$, hasta alcanzar un peso constante. Una vez secos, se guardaron en botes de poliestireno de 30 mL.

Botes para la toma de muestra de agua

Estos botes de polietileno de baja densidad (código 203010, Eurotubo, Deltalab, Barcelona) se utilizaron para recoger y almacenar las muestras de agua hasta su análisis. El proceso de limpieza requirió la presencia de dos personas que siguieron el protocolo "manos limpias-manos sucias" (de forma que una persona era la que abría y manipulaba el material cubriendo sus manos con doble guante de plástico, mientras que la segunda persona actuaba como auxiliar y su labor era manejar todo el resto del material necesario para la limpieza: tarros de agua desionizada Milli-Q, contenedores de ácido, abrir y cerrar los baños de ácido, manipular la campana de flujo laminar etc., con la premisa de que el auxiliar no debía tocar nunca el material que se estaba limpiando). En primer lugar, los botes se enjuagaron con agua desionizada Milli-Q 5

veces y se llenaron con disolución de HCl para análisis de concentración 3 mol L^{-1} , perfectamente cerrados con su tapón y evitando la presencia de burbujas en su interior. Así, se sumergieron en una disolución de HCl para análisis $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ en el interior de un bidón en el que se habían colocado previamente varias bolsas opacas que recubrían la pared del recipiente para evitar la posible contaminación de los botes por contacto. Se cerraron las bolsas y se precintó el bidón para evitar la salida de vapores ácidos. Los botes permanecieron en el interior del baño ácido al menos seis semanas. Pasado este tiempo, se enjuagaron 5 veces con agua desionizada Milli-Q en el interior de una campana de flujo laminar. Una vez enjuagados, se introdujeron en dobles bolsas de plástico con cierre hermético. Los ácidos utilizados durante este proceso pudieron ser reutilizados 5 veces sin que afectara a posteriores limpiezas.

Anexo 2. Equipos empleados

- Para efectuar las distintas pesadas en el laboratorio, se empleó la balanza analítica de dos campos Mettler AE 240 (Mettler, Suiza).
- Las medidas de pH se realizaron empleando un pH-metro CRISON pH ISE GLP 22 (Crison, España).
- Las medidas espectrofotométricas para el estudio de la estabilidad del reactivo 2-HBET (Capítulo II.B) se realizaron mediante un espectrofotómetro UV-Vis modelo Helios y 074515 (Unicam, Reino Unido) empleando para ello cubetas de 10 mm de cuarzo.
- El baño termostático empleado para los estudios de la influencia de la temperatura en el proceso de transporte a través de la membrana líquida fue de la marca TECTRON-100, 3473100 (Selecta, España).
- Las medidas de absorbancia (en Capítulo III.B) fueron llevadas a cabo con un espectrofotómetro Varian Cary 50 UV-Vis Spectrophotometer (Varian, USA), empleando cubetas de cuarzo de 10 mm.
- Las medidas de fluorescencia de las muestras fueron realizadas con ayuda de un equipo Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Varian, USA), empleando cubetas de cuarzo de 10 mm. El paso de luz para los procesos de excitación y emisión fue de 5 nm.

- Los espectros de Resonancia magnética nuclear fueron registrados con un equipo 500 MHz NMR Varian Unity INOVA Spectrometer (Varian, USA).
- Los espectros de masas de ambos compuestos se registraron usando un equipo LCQ™ quadrupole ion-trap mass spectrometer (Finnigan MAT, USA), empleando el método de ionización por electrospray (ESI).
- Las medidas por espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy, ICP-AES) se realizaron mediante un equipo ICP-AES THERMO Elemental/ IRIS INTREPID (Thermo Elemental, Reino Unido).
- Las medidas por espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS) se llevaron a cabo empleando el ICP-MS THERMO Elemental/SERIE X7 (Thermo Elemental, Reino Unido).
- Las medidas por espectroscopía de absorción atómica por llama se realizaron mediante un equipo Thermo Scientific ICE 3300 Series AA Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Reino Unido).
- Las medidas por espectroscopía de absorción atómica por horno de grafito se efectuaron mediante el equipo SOLAAR AA Spectrometer GF 95 graphite furnace with FS 95 furnace autosampler (Thermo Elemental, Reino Unido).
- Las medidas por voltamperometría de redisolución anódica de pulso diferencial diferencial (Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry, DPASV) fueron realizadas con el equipo equipo 746 VA Trace Analyzer processor con un electrodo 747 VA Stand (Metrohm, Suiza).
- La materia orgánica de las muestras de agua fue digerida mediante radiación UV con el equipo de digestión 705 UV Digester (Metrohm, Suiza) de lámpara a alta presión de mercurio (220V, 50Hz), empleando para ello tubos de cuarzo.
- Las medidas in situ de temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto del agua en la propia embarcación (Capítulo IV.B) se realizaron con sonda multiparamétrica portátil Sension 156 (Hach Co., Estados Unidos).
- Para la evaluación del contenido de materia orgánica en la materia suspendida y de materia orgánica en los sedimentos se empleó un horno mufla N 20/Hr (Nabertherm, Alemania).

- El carbono orgánico disuelto (COD) en las muestras de agua fue evaluado usando un equipo analizador de carbono, modelo 3100 (Analytik Jena, Alemania).
- La agitación de las muestras durante el proceso de lixiviación se efectuó con un agitador Promax 2020 Shaker (reciprocal motion) (Heidolph, Alemania) y los extractantes fueron posteriormente centrifugados en una centrifuga 4K10 Centrifuge (Sigma, Alemania).
- Para favorecer la disolución de reactivos o residuos sólidos en el método BCR se empleó un baño de ultrasonidos Ultrasons P-selecta (Selecta, España).
- Para el secado de filtros, sedimentos, o para la realización de la digestión ácida en aguas, se empleó una estufa calefactora (Selecta, España).
- Para el procedimiento de filtrado a vacío se empleó un embudo Büchner (sobre el que se colocó el correspondiente filtro) conectado a una bomba de vacío modelo D95 (Dinko, España).
- La digestión correspondiente a la Fase III (con H₂O₂) del procedimiento BCR se llevó a cabo en el interior de un baño de agua Precistern de 20 L 6000141/6000388 (Selecta, España).
- Para los experimentos de membrana líquida de volumen y las extracciones bajo agitación y calor de sedimentos, se empleó una placa agitadora calefactora de 135 mm diámetro, Carousel Standard, (Radleys, Reino Unido).
- Para la digestión total de sedimentos se emplearon lámparas de radiación infrarroja; en concreto, radiadores infrarrojo Siccatherm, SICCA 250 W, 240 V (Osram, España).
- El proceso de liofilización de las muestras biológicas se realizó mediante un equipo FreeZone Triad 7400030 (Cole-Parmer, Illinois U.S.A).
- La digestión ácida de las muestras biológicas fue realizada mediante un microondas Ethos 1600 Microwave Heating (Milestone, Italia).

Anexo 3. Reactivos y disoluciones

Anexo 3.1. Reactivos

El agua utilizada para la preparación de las disoluciones se obtuvo con el equipo de purificación *Elix 3* (Millipore, Estados Unidos), equipo que combina tecnologías de purificación complementarias: la unidad de ósmosis inversa elimina el 95-99% de los iones inorgánicos y el 99% de las sustancias disueltas ($P_m > 100$ Dalton), así como los microorganismos y las partículas; y el módulo Elix, por medio de las resinas de intercambio iónico, elimina los iones que han atravesado la membrana RO. Esta agua sirve de alimentación a un equipo *Milli-Q⁵⁰ System* (Millipore, Estados Unidos), que emplea un proceso de purificación de tres etapas. Un módulo de purificación Q-Gard adaptado al tipo de agua de alimentación lleva a cabo la purificación inicial a fin de optimizar el rendimiento de los medios posteriores. La segunda etapa es un módulo de ultrapurificación Quantum específico para la aplicación y diseñado para eliminar los contaminantes iónicos y orgánicos hasta niveles de trazas. La purificación final la realiza el filtro "Millipak" de 0,22 μm , que elimina las bacterias y las partículas de tamaño superior a 0,22 μm .

Para evitar una posible contaminación asociada a los reactivos utilizados, se emplearon reactivos de grado analítico (calidad *para análisis* o *Suprapur*) en todos los tratamientos realizados en el estudio de especiación de aguas y análisis de la muestra biológica. Los reactivos Suprapur, de pureza superior, se encuentran especialmente indicados para el análisis de trazas a nivel de $\mu\text{g L}^{-1}$ (partes por billón) en muestras de agua. A continuación se enumeran los reactivos utilizados durante la realización de este trabajo de investigación:

- 2-hidroxibenzaldehído o salicilaldehído 98% (2-HB), calidad para análisis (Sigma-Aldrich, Alemania).
- 2-hidroxi-1-naftaldehído (2-HN), calidad para análisis (Sigma-Aldrich, Alemania).
- 2,6-diaminopiridina 98% (2,6-DP), calidad para análisis (Sigma-Aldrich, Alemania).
- 4-etil-3-tiosemicarbazida 97% (ET), calidad para análisis (Sigma Aldrich, Alemania).
- 4-fenil-3-tiosemicarbazida (FT), calidad para análisis (Sigma-Aldrich, Alemania).
- Acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), calidad para análisis (Merck, Alemania).
- Acetato de sodio anhidro (CH_3COONa), calidad Suprapur (Merck, Alemania).
- Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano sulfónico (HEPES), calidad para análisis (Sigma-Aldrich, Alemania).

- Ácido acético glacial 100% anhidro (CH_3COOH), calidad para análisis (Merck, Alemania).
- Ácido acético glacial 100% anhidro (CH_3COOH), calidad Suprapur (Merck, Alemania).
- Ácido bórico (H_3BO_3), calidad para análisis (Merck, Alemania).
- Ácido clorhídrico fumante 37% (HCl), calidad para análisis (Merck, Alemania).
- Ácido clorhídrico 30% (HCl), calidad Suprapur (Merck, Alemania).
- Ácido fluorhídrico 48% (HF), calidad para análisis (Merck, Alemania).
- Ácido nítrico 65% (HNO_3), calidad para análisis (Merck, Alemania).
- Ácido nítrico 65% (HNO_3), calidad Suprapur (Merck, Alemania).
- Ácido ortofosfórico 85% (H_3PO_4), calidad para análisis (Merck, Alemania).
- Ácido perclórico 70% (HClO_4), calidad Suprapur (Merck, Alemania).
- Amoníaco en solución 25% (NH_3), calidad para análisis (Merck, Alemania).
- Amoníaco en solución 25% (NH_3), calidad Suprapur (Merck, Alemania).
- Cloruro de hidroxilamonio ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$), calidad para análisis (Merck, Alemania).
- Hidrógeno peróxido 30% (H_2O_2), calidad para análisis (Merck, Alemania).
- Hidrógeno peróxido 30% (H_2O_2), calidad Suprapur (Merck, Alemania).
- Hidróxido de sodio (NaOH), calidad para análisis (Merck, Alemania).
- Material de referencia certificado BCR-CRM 505 (muestra de agua de estuario, acidificada a pH 1,6) de la Community Bureau of Reference (BCR).
- Material de referencia certificado SRM 1646a (sedimento de estuario) de National Institute of Standards and Technology (NIST).
- Material de referencia certificado BCR-CRM 701 (sedimento de lago) de la Community Bureau of Reference (BCR).
- Material de referencia DOLT-3 (dogfish, hígado) de la National Research Council, Canadá.
- Material de referencia DORM-2 (dogfish, músculo) de la National Research Council, Canadá.
- Tetrahidrofurano anhidro (THF), calidad para análisis (Sigma-Aldrich, Alemania).
- Tolueno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$), calidad para análisis (Merck, Alemania).
- Sales cloradas: FeCl_3 , LiCl , NaCl , MgCl_2 , KCl , CaCl_2 , MnCl_2 , $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NiCl_2 , $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{SrCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, AgCl , $\text{BaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y PbCl_2 , calidad para análisis (Sigma-Aldrich, Alemania) (Capítulo III.B).
- Disoluciones patrones metálicas ICP Standard, de 1.000 mg L^{-1} (Merck, Alemania).

Anexo 3.2. Disoluciones

- Disoluciones reguladoras HEPES a pH 7 y 8 de concentración 1 mol L^{-1} : Se pesan 26,03 g de ácido (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano)sulfónico y se disuelve en agua Milli-Q⁵⁰ (Millipore), ajustándose el pH de la disolución hasta el valor deseado con ácido clorhídrico 30% (calidad Suprapur, Merck (Alemania)) y enrasando hasta 100 mL.
- Disolución reguladora $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ a pH 8-8,5 de concentración 6 mol L^{-1} : Se añade un volumen de 45 mL de NH_3 (calidad para análisis, Merck (Alemania)) a 21 mL de HCl al 37% (calidad para análisis, Merck (Alemania)) y se enrasa con agua Milli-Q⁵⁰ (Millipore) en un matraz aforado de 100 mL.
- Disolución reguladora $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ a pH 8-8,5 de concentración 8 mol L^{-1} : Se añade un volumen de 60 mL de NH_3 (calidad para análisis, Merck (Alemania)) a 29 mL de HCl al 37% (calidad para análisis, Merck (Alemania)) y se enrasa con agua Milli-Q⁵⁰ (Millipore) en un matraz aforado de 100 mL.
- Disoluciones reguladoras de pH Britton-Robinson: Estas disoluciones reguladoras fueron preparadas tomando como base los cálculos de concentraciones recogidos en un trabajo publicado por Mongay y Cerdá [Mongay y Cerdá, 1977] en el cual se especifican las cantidades de las sales correspondientes para elaborar disoluciones reguladoras a diferentes valores de pH con igual fuerza iónica. Dado que el procedimiento de ajuste del pH para las disoluciones en la fase cargada de la membrana líquida consistía en la adición de una alícuota de disolución reguladora a una cierta cantidad de muestra, se optó por aumentar las concentraciones de cada una de las sales especificadas en dicho artículo 10 veces, con objeto de aumentar su fuerza tamponante respetando los valores de pH, de forma que su dilución en la muestra de medida permitiese mantener una fuerza tamponante suficiente al pH especificado.

Con objeto de minimizar la contaminación de las disoluciones reguladoras, éstas fueron preparadas utilizando los reactivos de elevada pureza que se muestran en la tabla A.1 y tomando en todo momento las precauciones necesarias para evitar su contaminación tanto por recipientes como por su manipulación y conservación. Todas las disoluciones fueron preparadas utilizando agua desionizada Milli-Q⁵⁰.

Tabla A.1. Reactivos utilizados en la preparación de reguladoras Britton-Robinson

Reactivos		Peso molecular (g mol ⁻¹)	% Pureza	d (g mL ⁻¹)
Hidróxido sódico (PA, Merck)	NaOH	40,00	99	-
Ácido acético (PA, Merck)	CH ₃ COOH	60,05	100	1,05
Ácido ortofosfórico (PA, Merck)	H ₃ PO ₄	98,00	85	1,71
Ácido bórico (PA, Merck)	H ₃ BO ₃	61,83	99,8	-
Cloruro potásico (PA, Merck)	KCl	74,56	99,5	-

Para la obtención de las diferentes disoluciones reguladoras de pH el procedimiento fue preparar, por un lado, las reguladoras con pH extremos (una a un pH muy ácido y otra a un pH muy básico), y por otro, preparar las disoluciones de valores de pH intermedios (entre 6 y 8) para posteriormente ajustar el pH exacto con ayuda de las reguladoras de pH extremos preparadas inicialmente. En la Tabla A.2 se muestran las cantidades y volúmenes necesarios para la preparación de las disoluciones según el valor de pH.

Tabla A.2. Cantidades empleadas para la preparación de las disoluciones reguladoras Britton-Robinson de 1,5 mol L⁻¹ de fuerza iónica y un volumen total de 100 mL [Mongay y Cerdá, 1977]

Reactivo	Concentración y masa/volumen	Valores de pH				
		1,98	6,09	7,00	7,96	11,98
NaOH	g	0,385	2,410	2,782	3,030	4,040
	mol L ⁻¹	0,096	0,603	0,695	0,758	1,010
CH ₃ COOH	mL	2,179	1,606	1,500	1,430	1,144
	mol L ⁻¹	0,381	0,281	0,262	0,250	0,200
H ₃ PO ₄	mL	2,568	1,893	1,768	1,686	1,348
	mol L ⁻¹	0,448	0,330	0,309	0,294	0,235
H ₃ BO ₃	g	2,360	1,739	1,625	1,540	1,239
	mol L ⁻¹	0,382	0,281	0,263	0,251	0,200
Fuerza iónica	mol L ⁻¹	0,180	0,603	0,758	0,952	1,280
KCl	g	9,891	6,722	5,560	4,106	1,649
	mol L ⁻¹	1,320	0,897	0,742	0,548	0,220

- Disolución reguladora $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ a pH 4,7 de concentración 3 mol L^{-1} : Se preparó ácido acético Suprapur a una concentración 6 mol L^{-1} , tomándose para ello 34 mL de ácido acético glacial al 100% y enrasándose hasta 100 mL con agua Milli-Q. Se pesaron 123,05 g de acetato de sodio Suprapur, se disolvieron en 300 mL de agua Milli-Q y se ajustó su pH hasta un valor de 4,7 adicionando el ácido acético 6 mol L^{-1} preparado previamente. Finalmente, se enrasó hasta 500 mL con agua desionizada Milli-Q.
- Disoluciones de metales: Las disoluciones de los metales utilizados fueron preparadas por dilución de patrones estándar comerciales de Ti(I), Pb(II), V(V), Ti(IV), Ag(I) y Cr(II) de 1000 mg L^{-1} (Merck, Alemania). Es frecuente la preparación de patrones metálicos intermedios, para evitar la necesidad de tomar volúmenes demasiado pequeños en el caso de disoluciones poco concentradas (del orden de los $\mu\text{g L}^{-1}$). A estas disoluciones de metal se les añade HNO_3 para su conservación, en una relación de 50 μL de HNO_3 concentrado Suprapur por cada 25 mL de disolución. En los estudios realizados en este capítulo para la preconcentración de Pb(II), se añadió el volumen adecuado de disolución de metal junto con el volumen necesario de disolución reguladora y las cantidades requeridas NaCl, sales u otros metales en los estudios de salinidad e interferencias, enrasando finalmente con agua desionizada Milli-Q.
- Disolución de 2-HBET $1,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ en tolueno: Para preparar la disolución orgánica que constituía la membrana líquida, se pesaron 31,7 g de reactivo 2-HBET y se disolvieron con tolueno en un matraz aforado de 100 mL.
- Disolución de ácido nítrico $0,3 \text{ mol L}^{-1}$: Para preparar la disolución constituyente de la fase receptora, se tomaron 5,2 mL de ácido nítrico para análisis, al 65%, y se llevaron hasta un volumen final de 250 mL enrasando con agua desionizada Milli-Q hasta dicho volumen.
- Disoluciones intermedias de sensores 2-HNFT y 2-HNDP $100 \mu\text{mol L}^{-1}$: Se pesaron 3,206 mg y 4,175 mg respectivamente, y se enrasaron con una mezcla de THF: H_2O (9:1) hasta un volumen de 100 mL.
- Disoluciones intermedias de metales a partir de sales cloradas $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ y $500 \mu\text{mol L}^{-1}$: Se pesaron las siguientes cantidades de sales (Tabla A.3) y se enrasaron con agua destilada hasta un volumen de 100 mL (Capítulo III.B).
- Disolución de ácido clorhídrico $3,86 \text{ mol L}^{-1}$: Se tomaron 320 mL de HCl para análisis, al 37%, y se enrasó hasta 1 L con agua desionizada Milli-Q.

- Disolución de ácido acético $0,11 \text{ mol L}^{-1}$: Para preparar esta disolución se tomaron 6,25 mL de ácido acético glacial para análisis y se enrasaron hasta 1 L con agua desionizada Milli-Q.

Tabla A.3. Cantidades de sales empleadas para la preparación de disoluciones metálicas acuosas de $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ y $500 \mu\text{mol L}^{-1}$

Sales metálicas	Cantidades (mg) para $250 \mu\text{mol L}^{-1}$	Cantidades (mg) para $500 \mu\text{mol L}^{-1}$
LiCl	1,060	2,120
NaCl	1,461	2,922
MgCl ₂	2,380	4,760
KCl	1,864	3,728
CaCl ₂	2,775	5,550
MnCl ₂	3,146	6,292
FeCl ₃	4,055	8,110
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5,948	11,896
NiCl ₂	3,241	6,482
CuCl ₂ ·2H ₂ O	4,262	8,524
ZnCl ₂	3,408	6,816
SrCl ₂ ·6H ₂ O	6,663	13,326
AgCl	3,583	7,166
BaCl ₂ ·2H ₂ O	6,107	12,214
PbCl ₂	6,953	13,906

- Disolución de cloruro de hidroxilamonio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 1,5: Se disolvieron 34,75 g de cloruro de hidroxilamonio en 500 mL de agua desionizada Milli-Q, ajustándose el pH hasta un valor de 1,5 mediante el empleo de HNO₃ Suprapur al 65%. Finalmente, se enrasó hasta un volumen de 1 L con agua desionizada.
- Disolución de acetato amónico 1 mol L^{-1} a pH 2: Se disolvieron 77 g de acetato amónico de calidad para análisis en 500 mL de agua desionizada Milli-Q, ajustándose el pH hasta un valor de 2 mediante el empleo de HNO₃ Suprapur al 65%. Finalmente, se enrasó hasta un volumen de 1 L con agua desionizada.

Anexo 4. Datos biológicos de los peces

Tabla A.4. Datos de peso y longitud de los peces analizados

Muestreo	Punto muestreo	Pez	Especie	Peso (g)	Longitud (cm)
1	Getares	1	Sargo	143	21
1	Getares	4	Lenguado	236	29
1	Getares	5	Lenguado	115	23
1	Getares	7	Lenguado	225	28
1	Palmones	1	Rubio	355	32
1	Puente Mayorga	1	Rubio	76	19,6
1	Puente Mayorga	2	Lenguado	359	32,5
2	Getares	1	Lenguado	135	24,1
2	Getares	2	Lenguado	135,6	23,9
2	Getares	3	Lenguado	114,1	21,2
2	Getares	4	Lenguado	170,4	25,9
2	Getares	5	Lenguado	149,1	25
2	Getares	6	Lenguado	152,8	25,8
2	Getares	8	Lenguado	182,9	27,5
2	Getares	9	Lenguado	111,9	23
2	Getares	10	Lenguado	130	24,5
2	Getares	11	Lenguado	133,6	23,5
2	Getares	12	Lenguado	273,8	30,5
2	Getares	13	Lenguado	198,9	27,9
2	Getares	14	Sargo	77,2	7,5
2	Getares	15	Lenguado	223	29,2
2	Getares	17	Lenguado	201	28,2
2	Isla Verde	3	Lenguado	241,9	28,7
2	Isla Verde	4	Lenguado	286,6	31,6
2	Isla Verde	5	Lenguado	385,5	36,8
2	Palmones	3	Lenguado	196,9	27,5
2	Palmones	6	Rubio	339,2	34,5
2	Palmones	7	Rubio	400	37
2	Palmones	8	Rubio	371	34
2	Palmones	9	Rubio	326,6	32,1
2	Palmones	10	Rubio	352,8	33,9
2	Palmones	11	Rubio	290,6	31,2
2	Palmones	12	Rubio	318,6	34,1
2	Palmones	13	Rubio	348,2	32,6

Tabla A.4 (cont.). Datos de peso y longitud de los peces analizados

Muestreo	Punto muestreo	Pez	Especie	Peso (g)	Longitud (cm)
2	Palmones	14	Rubio	400	39
2	Palmones	15	Rubio	305,8	31,9
2	Palmones	16	Rubio	290,3	38,3
2	Palmones	17	Rubio	299,4	31,6
2	Guadarranque	2	Lenguado	213,4	27,9
2	Puente Mayorga	1	Lenguado	235	28,5
2	Puente Mayorga	3	Lenguado	171,9	26
3	Getares	1	Lenguado	173,9	25,4
3	Getares	3	Lenguado	150	24,6
3	Getares	4	Lenguado	256	31
3	Getares	6	Lenguado	237	28,6
3	Getares	7	Lenguado	237	28,5
3	Getares	8	Rascacio	345	25,8
3	Getares	9	Rubio	261	29
3	Getares	10	Rascacio	206,3	20
3	Getares	11	Lenguado	348	35
3	Getares	12	Rascacio	324	25
3	Getares	13	Rascacio	>440	34,6
3	Isla Verde	7	Rascacio	>440	31
3	Isla Verde	8	Rascacio	283,5	28
3	Isla Verde	9	Rascacio	293	24
3	Isla Verde	10	Rascacio	341	28
3	Palmones	1	Rubio	174,8	26,3
3	Palmones	3	Lenguado	196	26
3	Palmones	4	Lenguado	74,9	20
3	Palmones	5	Rubio	177	27
3	Palmones	6	Lenguado	148	26
3	Palmones	7	Lenguado	217,4	29,5
3	Guadarranque	1	Rubio	175,1	25,8
3	Guadarranque	2	Rascacio	133	18,5
3	Guadarranque	4	Rascacio	108	18
3	Guadarranque	5	Rubio	134,8	23
3	Guadarranque	6	Rubio	135	24
3	Puente Mayorga	1	Rubio	124,2	23
3	Puente Mayorga	2	Lenguado	>440	36
3	Puente Mayorga	3	Lenguado	427	35,1

Tabla A.4 (cont.). Datos de peso y longitud de los peces analizados

Muestreo	Punto muestreo	Pez	Especie	Peso (g)	Longitud (cm)
3	Puente Mayorga	4	Lenguado	137	28
4	Getares	1	Lenguado	193,2	25,7
4	Getares	2	Lenguado	193,2	25,7
4	Getares	3	Lenguado	130,2	24
4	Getares	4	Lenguado	121,7	25
4	Getares	5	Lenguado	165,7	25,7
4	Getares	6	Lenguado	117,4	23,3
4	Getares	7	Lenguado	82	20,4
4	Getares	9	Rascacio	149	20
4	Getares	10	Sargo	149	20
4	Isla Verde	2	Sargo	59,8	36
4	Isla Verde	3	Sargo	152,5	21
4	Guadarranque	1	Lenguado	202	27
4	Guadarranque	2	Lenguado	78,5	19,8
4	Guadarranque	4	Rubio	112,5	22,3
4	Guadarranque	9	Rascacio	117,9	17
4	Guadarranque	10	Rascacio	88,4	16,2
4	Guadarranque	11	Rascacio	101,4	17,2

Anexo 5. Base de datos de los metales Zn, Cd, Pb, Cu en cada compartimento

Anexo 5.1. Datos de concentración de la especiación metálica en las muestras de agua

Tabla A.5. Datos de concentración de la especiación metálica de Zn en agua ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Muestreo	Punto muestreo	Fracción	Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	Getares	Total	9,622±0,090
1	Getares	Disuelta	1,352±0,176
1	Getares	Particulada	8,270±0,198
1	Isla Verde	Total	4,994±0,485
1	Isla Verde	Disuelta	4,330±0,585
1	Isla Verde	Particulada	0,665±0,760
1	Palmones	Total	6,104±0,336
1	Palmones	Disuelta	2,246±0,259
1	Palmones	Particulada	3,858±0,425
1	Guadarranque	Total	5,616±0,391
1	Guadarranque	Disuelta	1,707±0,597
1	Guadarranque	Particulada	3,908±0,714
1	Puente Mayorga	Total	4,626±0,180
1	Puente Mayorga	Disuelta	3,641±0,520
1	Puente Mayorga	Particulada	0,985±0,550
2	Getares	Total	8,045±0,445
2	Getares	Disuelta	<LD
2	Getares	Particulada	8,045±0,445
2	Isla Verde	Total	7,588±0,455
2	Isla Verde	Disuelta	0,748±0,052
2	Isla Verde	Particulada	6,839±0,458
2	Palmones	Total	8,672±0,177
2	Palmones	Disuelta	3,663±0,116
2	Palmones	Particulada	5,009±0,212
2	Guadarranque	Total	1,496±0,260
2	Guadarranque	Disuelta	0,860±0,131
2	Guadarranque	Particulada	0,636±0,291
2	Puente Mayorga	Total	2,707 ±0,439
2	Puente Mayorga	Disuelta	0,978±0,095
2	Puente Mayorga	Particulada	1,730±0,449

Tabla A.5 (cont.). Datos de concentración de la especiación metálica de Zn en agua ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Muestreo	Punto muestreo	Fracción	Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$)
3	Getares	Total	0,858±0,042
3	Getares	Disuelta	0,633±0,001
3	Getares	Particulada	0,225±0,042
3	Isla Verde	Total	1,510±0,086
3	Isla Verde	Disuelta	0,276±0,030
3	Isla Verde	Particulada	1,234±0,091
3	Palmones	Total	2,273±0,205
3	Palmones	Disuelta	0,127± 0,019
3	Palmones	Particulada	2,146±0,206
3	Guadarranque	Total	1,130±0,061
3	Guadarranque	Disuelta	0,356±0,038
3	Guadarranque	Particulada	0,774±0,072
3	Puente Mayorga	Total	5,950±0,638
3	Puente Mayorga	Disuelta	<LD
3	Puente Mayorga	Particulada	5,950±0,638
4	Getares	Total	0,981±0,213
4	Getares	Disuelta	1,624±0,047
4	Getares	Particulada	0,357±0,218
4	Isla Verde	Total	0,989±0,110
4	Isla Verde	Disuelta	0,529±0,087
4	Isla Verde	Particulada	0,460±0,140
4	Palmones	Total	3,512±0,058
4	Palmones	Disuelta	0,774±0,071
4	Palmones	Particulada	2,738±0,091
4	Guadarranque	Total	0,820±0,038
4	Guadarranque	Disuelta	0,453±0,032
4	Guadarranque	Particulada	0,368±0,050
4	Puente Mayorga	Total	1,162±0,026
4	Puente Mayorga	Disuelta	0,841±0,068
4	Puente Mayorga	Particulada	0,321±0,073

Tabla A.6. Datos de concentración de la especiación metálica de Cd en agua ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Muestreo	Punto muestreo	Fracción	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	Getares	Total	<LD
1	Getares	Disuelta	<LD
1	Getares	Particulada	<LD
1	Isla Verde	Total	0,056±0,002
1	Isla Verde	Disuelta	0,054±0,007
1	Isla Verde	Particulada	0,002±0,007
1	Palmones	Total	0,092±0,011
1	Palmones	Disuelta	0,084±0,009
1	Palmones	Particulada	0,008±0,014
1	Guadarranque	Total	<LD
1	Guadarranque	Disuelta	<LD
1	Guadarranque	Particulada	<LD
1	Puente Mayorga	Total	<LD
1	Puente Mayorga	Disuelta	<LD
1	Puente Mayorga	Particulada	<LD
2	Getares	Total	<LD
2	Getares	Disuelta	<LD
2	Getares	Particulada	<LD
2	Isla Verde	Total	0,065±0,007
2	Isla Verde	Disuelta	0,063±0,005
2	Isla Verde	Particulada	0,002±0,008
2	Palmones	Total	0,096±0,004
2	Palmones	Disuelta	0,085±0,009
2	Palmones	Particulada	0,011±0,010
2	Guadarranque	Total	<LD
2	Guadarranque	Disuelta	<LD
2	Guadarranque	Particulada	<LD
2	Puente Mayorga	Total	<LD
2	Puente Mayorga	Disuelta	<LD
2	Puente Mayorga	Particulada	<LD
3	Getares	Total	<LD
3	Getares	Disuelta	<LD
3	Getares	Particulada	<LD
3	Isla Verde	Total	<LD
3	Isla Verde	Disuelta	<LD
3	Isla Verde	Particulada	<LD

Tabla A.6 (cont.). Datos de concentración de la especiación metálica de Cd en agua ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Muestreo	Punto muestreo	Fracción	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)
3	Palmones	Total	<LD
3	Palmones	Disuelta	<LD
3	Palmones	Particulada	<LD
3	Guadarranque	Total	<LD
3	Guadarranque	Disuelta	<LD
3	Guadarranque	Particulada	<LD
3	Puente Mayorga	Total	<LD
3	Puente Mayorga	Disuelta	<LD
3	Puente Mayorga	Particulada	<LD
4	Getares	Total	<LD
4	Getares	Disuelta	<LD
4	Getares	Particulada	<LD
4	Isla Verde	Total	<LD
4	Isla Verde	Disuelta	<LD
4	Isla Verde	Particulada	<LD
4	Palmones	Total	<LD
4	Palmones	Disuelta	<LD
4	Palmones	Particulada	<LD
4	Guadarranque	Total	<LD
4	Guadarranque	Disuelta	<LD
4	Guadarranque	Particulada	<LD
4	Puente Mayorga	Total	<LD
4	Puente Mayorga	Disuelta	<LD
4	Puente Mayorga	Particulada	<LD

Tabla A.7. Datos de concentración de la especiación metálica de Pb en agua ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Muestreo	Punto muestreo	Fracción	Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	Getares	Total	0,651±0,083
1	Getares	Disuelta	<LD
1	Getares	Particulada	0,651±0,083
1	Isla Verde	Total	2,340±0,553
1	Isla Verde	Disuelta	1,157±0,107
1	Isla Verde	Particulada	1,183±0,564
1	Palmones	Total	1,878±0,151
1	Palmones	Disuelta	0,529±0,115
1	Palmones	Particulada	1,349±0,190
1	Guadarranque	Total	0,516±0,115
1	Guadarranque	Disuelta	0,249±0,026
1	Guadarranque	Particulada	0,267±0,118
1	Puente Mayorga	Total	0,475±0,036
1	Puente Mayorga	Disuelta	0,273±0,076
1	Puente Mayorga	Particulada	0,202±0,084
2	Getares	Total	1,660±0,018
2	Getares	Disuelta	0,288±0,061
2	Getares	Particulada	1,372±0,064
2	Isla Verde	Total	0,360±0,087
2	Isla Verde	Disuelta	0,268±0,006
2	Isla Verde	Particulada	0,092±0,087
2	Palmones	Total	0,335±0,017
2	Palmones	Disuelta	0,246±0,016
2	Palmones	Particulada	0,089±0,023
2	Guadarranque	Total	<LD
2	Guadarranque	Disuelta	<LD
2	Guadarranque	Particulada	<LD
2	Puente Mayorga	Total	<LD
2	Puente Mayorga	Disuelta	<LD
2	Puente Mayorga	Particulada	<LD
3	Getares	Total	0,275±0,051
3	Getares	Disuelta	<LD
3	Getares	Particulada	0,275±0,051
3	Isla Verde	Total	0,415±0,029
3	Isla Verde	Disuelta	0,225±0,021
3	Isla Verde	Particulada	0,190±0,036

Tabla A.7 (cont.). Datos de concentración de la especiación metálica de Pb en agua ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Muestreo	Punto muestreo	Fracción	Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)
3	Palmones	Total	$0,212 \pm 0,078$
3	Palmones	Disuelta	<LD
3	Palmones	Particulada	$0,212 \pm 0,078$
3	Guadarranque	Total	<LD
3	Guadarranque	Disuelta	<LD
3	Guadarranque	Particulada	<LD
3	Puente Mayorga	Total	$0,347 \pm 0,011$
3	Puente Mayorga	Disuelta	<LD
3	Puente Mayorga	Particulada	$0,347 \pm 0,011$
4	Getares	Total	$0,247 \pm 0,047$
4	Getares	Disuelta	$0,088 \pm 0,004$
4	Getares	Particulada	$0,159 \pm 0,048$
4	Isla Verde	Total	<LD
4	Isla Verde	Disuelta	<LD
4	Isla Verde	Particulada	<LD
4	Palmones	Total	$0,106 \pm 0,010$
4	Palmones	Disuelta	<LD
4	Palmones	Particulada	$0,106 \pm 0,010$
4	Guadarranque	Total	$0,164 \pm 0,048$
4	Guadarranque	Disuelta	<LD
4	Guadarranque	Particulada	$0,164 \pm 0,048$
4	Puente Mayorga	Total	<LD
4	Puente Mayorga	Disuelta	<LD
4	Puente Mayorga	Particulada	<LD

Tabla A.8. Datos de concentración de la especiación metálica de Cu en agua ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Muestreo	Punto muestreo	Fracción	Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	Getares	Total	<LD
1	Getares	Disuelta	<LD
1	Getares	Particulada	<LD
1	Isla Verde	Total	0,514±0,097
1	Isla Verde	Disuelta	<LD
1	Isla Verde	Particulada	0,514±0,097
1	Palmones	Total	0,859±0,053
1	Palmones	Disuelta	<LD
1	Palmones	Particulada	0,859±0,053
1	Guadarranque	Total	<LD
1	Guadarranque	Disuelta	<LD
1	Guadarranque	Particulada	<LD
1	Puente Mayorga	Total	<LD
1	Puente Mayorga	Disuelta	<LD
1	Puente Mayorga	Particulada	<LD
2	Getares	Total	<LD
2	Getares	Disuelta	<LD
2	Getares	Particulada	<LD
2	Isla Verde	Total	<LD
2	Isla Verde	Disuelta	<LD
2	Isla Verde	Particulada	<LD
2	Palmones	Total	<LD
2	Palmones	Disuelta	<LD
2	Palmones	Particulada	<LD
2	Guadarranque	Total	<LD
2	Guadarranque	Disuelta	<LD
2	Guadarranque	Particulada	<LD
2	Puente Mayorga	Total	0,498±0,061
2	Puente Mayorga	Disuelta	<LD
2	Puente Mayorga	Particulada	0,498±0,061
3	Getares	Total	<LD
3	Getares	Disuelta	<LD
3	Getares	Particulada	<LD
3	Isla Verde	Total	<LD
3	Isla Verde	Disuelta	<LD
3	Isla Verde	Particulada	<LD

Tabla A.8 (cont.). Datos de concentración de la especiación metálica de Cu en agua ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Muestreo	Punto muestreo	Fracción	Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)
3	Palmones	Total	<LD
3	Palmones	Disuelta	<LD
3	Palmones	Particulada	<LD
3	Guadarranque	Total	<LD
3	Guadarranque	Disuelta	<LD
3	Guadarranque	Particulada	<LD
3	Puente Mayorga	Total	0,450±0,035
3	Puente Mayorga	Disuelta	<LD
3	Puente Mayorga	Particulada	0,450±0,035
4	Getares	Total	1,605±0,063
4	Getares	Disuelta	1,444±0,058
4	Getares	Particulada	0,161±0,086
4	Isla Verde	Total	<LD
4	Isla Verde	Disuelta	<LD
4	Isla Verde	Particulada	<LD
4	Palmones	Total	0,809±0,013
4	Palmones	Disuelta	0,362±0,056
4	Palmones	Particulada	0,447±0,058
4	Guadarranque	Total	<LD
4	Guadarranque	Disuelta	<LD
4	Guadarranque	Particulada	<LD
4	Puente Mayorga	Total	<LD
4	Puente Mayorga	Disuelta	<LD
4	Puente Mayorga	Particulada	<LD

Anexo 5.2. Datos de concentración de la especiación metálica en las muestras de sedimentos

Tabla A.9. Datos de concentración de especiación: Zn, Cd, Pb y Cu en sedimentos (mg kg⁻¹)

M (1)	PM (2)	Fase	Zn (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)	Pb (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)
1	1	I	<LD	<LD	<LD	<LD
1	1	II	3,134±0,106	<LD	<LD	<LD
1	1	III	7,191±0,121	<LD	2,713±0,104	2,447±0,162
1	1	IV	46,691±0,94	<LD	14,870±1,786	15,816±0,720
1	2	I	<LD	<LD	<LD	<LD
1	2	II	3,900±0,052	<LD	0,295±0,084	<LD
1	2	III	10,706±0,08	<LD	3,618±0,065	2,957±0,025
1	2	IV	76,962±2,26	<LD	30,216±0,482	27,939±1,761
1	3	I	22,797±0,68	0,110±0,00	0,869±0,207	1,870±0,056
1	3	II	21,480±0,54	<LD	17,960±0,106	7,033±0,369
1	3	III	5,625±0,144	<LD	1,036±0,002	3,740±0,149
1	3	IV	71,046±4,25	0,135±0,05	16,733±3,767	40,079±2,320
1	4	I	13,219±0,32	0,072±0,00	<LD	0,459±0,013
1	4	II	23,048±2,13	<LD	16,336±0,930	1,870±0,051
1	4	III	6,203±0,236	<LD	2,481±0,133	7,101±0,170
1	4	IV	33,622±4,28	0,126±0,07	11,336±1,203	18,642±1,801
1	5	I	<LD	<LD	<LD	0,561±0,047
1	5	II	5,517±2,421	<LD	1,203±0,228	<LD
1	5	III	8,656±2,850	<LD	8,960±0,203	5,096±0,709
1	5	IV	54,892±7,81	<LD	21,870±5,393	21,407±2,159
2	1	I	<LD	<LD	<LD	<LD
2	1	II	6,394±0,081	<LD	1,259±0,013	<LD
2	1	III	4,709±0,575	<LD	2,443±0,077	0,806±0,036
2	1	IV	27,774±0,51	<LD	16,681±0,218	9,667±0,512

Tabla A.9 (cont.). Datos de concentración de especiación: Zn, Cd, Pb y Cu en sedimentos (mg kg^{-1})

M (1)	PM (2)	Fase	Zn (mg kg^{-1})	Cd (mg kg^{-1})	Pb (mg kg^{-1})	Cu (mg kg^{-1})
2	2	I	0,859±0,024	<LD	<LD	<LD
2	2	II	5,206±0,576	<LD	<LD	<LD
2	2	III	13,066±0,03	<LD	7,687±0,584	5,325±0,050
2	2	IV	60,443±5,51	<LD	21,653±3,250	20,287±1,434
2	3	I	12,196±0,61	0,078±0,01	<LD	0,524±0,030
2	3	II	20,807±9,26	<LD	12,783±3,583	3,434±0,934
2	3	III	4,037±0,129	<LD	1,590±0,944	1,644±0,281
2	3	IV	49,289±0,74	0,143±0,00	12,349±3,966	24,690±0,530
2	4	I	8,751±0,466	<LD	1,106±0,021	0,365±0,063
2	4	II	11,899±0,15	<LD	9,796±0,036	3,023±0,017
2	4	III	3,133±0,243	<LD	0,731±0,124	2,228±0,052
2	4	IV	21,630±3,14	<LD	9,340±3,515	7,988±1,706
2	5	I	3,287±0,422	<LD	0,698±0,162	<LD
2	5	II	11,728±3,13	<LD	8,210±0,209	3,442±1,449
2	5	III	1,942±0,703	<LD	0,655±0,106	0,981±0,322
2	5	IV	20,628±0,38	<LD	6,028±0,176	6,099±0,240
3	1	I	<LD	<LD	<LD	<LD
3	1	II	5,741±0,053	<LD	0,387±0,015	<LD
3	1	III	9,685±0,090	<LD	8,994±0,416	2,884±0,162
3	1	IV	70,938±4,49	0,194±0,07	23,488±1,394	16,422±0,944
3	2	I	0,599±0,104	<LD	<LD	0,638±0,009
3	2	II	8,254±0,043	<LD	0,656±0,010	8,254±0,043
3	2	III	11,549±0,25	<LD	9,973±0,122	8,518±0,076
3	2	IV	99,169±7,65	0,226±0,08	26,726±1,808	37,309±2,392
3	3	I	10,003±0,10	0,102±0,00	0,524±0,029	0,707±0,004
3	3	II	12,393±0,02	<LD	10,523±0,057	4,755±0,065
3	3	III	3,480±0,082	<LD	0,842±0,015	1,772±0,049

Tabla A.9 (cont).. Datos de concentración de especiación: Zn, Cd, Pb y Cu en sedimentos (mg kg^{-1})

M (1)	PM (2)	Fase	Zn (mg kg^{-1})	Cd (mg kg^{-1})	Pb (mg kg^{-1})	Cu (mg kg^{-1})
3	3	IV	47,215±4,84	0,139±0,02	9,349±0,064	21,202±1,256
3	4	I	9,682±0,008	0,076±0,00	<LD	0,367±0,009
3	4	II	23,567±0,88	<LD	14,510±0,927	4,823±0,036
3	4	III	4,596±0,062	<LD	1,369±0,152	2,667±0,165
3	4	IV	44,345±3,92	0,206±0,03	14,022±2,287	19,066±1,857
3	5	I	1,178±0,075	0,065±0,00	<LD	<LD
3	5	II	40,645±0,10	<LD	11,261±0,453	4,602±0,049
3	5	III	5,052±0,114	<LD	1,131±0,095	2,294±0,075
3	5	IV	53,340±9,00	0,167±0,00	11,366±0,951	19,746±3,299
4	1	I	<LD	<LD	<LD	<LD
4	1	II	21,445±2,38	<LD	0,298±0,047	<LD
4	1	III	13,106±0,19	<LD	5,750±0,012	3,192±0,027
4	1	IV	51,055±3,39	0,108±0,03	20,600±1,685	12,971±0,150
4	2	I	<LD	<LD	<LD	0,393±0,037
4	2	II	5,772±0,055	<LD	<LD	<LD
4	2	III	9,304±0,220	<LD	7,618±0,059	5,231±0,107
4	2	IV	66,956±2,23	0,206±0,06	28,550±0,020	22,988±2,053
4	3	I	8,928±0,048	0,079±0,01	0,471±0,014	0,726±0,010
4	3	II	10,943±0,17	<LD	8,967±0,034	3,940±0,015
4	3	III	3,014±0,193	<LD	0,816±0,070	1,742±0,083
4	3	IV	59,325±2,76	0,143±0,01	11,086±0,657	27,255±1,843
4	4	I	6,594±0,071	<LD	0,759±0,002	0,580±0,029
4	4	II	7,174±0,421	<LD	9,481±0,359	2,453±0,098
4	4	III	<LD	<LD	0,492±0,040	0,500±0,016
4	4	IV	15,175±0,01	0,081±0,01	9,571±1,726	5,492±0,370

Tabla A.9 (cont.). Datos de concentración de especiación: Zn, Cd, Pb y Cu en sedimentos (mg kg^{-1})

M (¹)	PM (²)	Fase	Zn (mg kg^{-1})	Cd (mg kg^{-1})	Pb (mg kg^{-1})	Cu (mg kg^{-1})
4	5	I	0,696±0,010	<LD	<LD	<LD
4	5	II	13,097±0,67	<LD	12,333±3,880	3,266±0,001
4	5	III	2,762±0,553	<LD	0,835±0,025	1,472±0,028
4	5	IV	34,893±0,41	0,172±0,09	10,612±1,325	11,561±0,306

⁽¹⁾ Muestreo⁽²⁾ Punto de muestreo: 1- Getares; 2- Isla Verde; 3- Palmones; 4- Guadarranque; 5-Puente Mayorga

Anexo 5.3. Datos de concentración de concentración metálica en las muestras de peces

Tabla A.10. Datos de concentración de Zn, Cd, Pb y Cu en peces (mg kg⁻¹)

M (1)	PM (2)	nº pez	Especie (3)	Tejido (4)	Zn	Cd	Pb	Cu
1	1	1	S	B	648,507	<LD	5,558	2,548
1	1	1	S	H	65,701	0,472	1,514	607,240
1	1	1	S	M	43,780	<LD	<LD	1,346
1	1	4	L	B	45,943	<LD	0,280	4,087
1	1	4	L	H	113,673	0,825	2,158	754,855
1	1	4	L	M	17,484	<LD	<LD	0,843
1	1	5	L	B	59,452	<LD	0,434	4,044
1	1	5	L	H	100,027	0,5162	2,568	353,093
1	1	5	L	M	13,353	<LD	<LD	0,559
1	1	7	L	B	48,421	<LD	<LD	2,097
1	1	7	L	H	70,222	0,464	1,419	519,782
1	1	7	L	M	16,758	<LD	<LD	0,726
1	3	1	Ru	H	171,650	0,076	0,807	49,605
1	3	1	Ru	M	20,909	<LD	0,800	1,436
1	5	1	Ru	B	<LD	<LD	1,267	3,987
1	5	1	Ru	H	62,985	<LD	0,473	1,968
1	5	1	Ru	M	16,289	<LD	<LD	0,728
1	5	2	L	B	55,535	<LD	0,791	4,561
1	5	2	L	H	117,941	0,978	2,403	1504,650
1	5	2	L	M	19,954	<LD	0,290	1,357
2	1	1	L	B	56,098	<LD	39,083	2,753
2	1	1	L	H	95,209	1,087	2,757	572,585
2	1	1	L	M	26,913	<LD	<LD	1,114
2	1	2	L	B	53,763	<LD	1,131	4,218
2	1	2	L	M	12,421	<LD	<LD	0,896
2	1	3	L	B	60,402	<LD	15,681	2,648
2	1	3	L	H	92,228	2,043	5,638	20,367
2	1	3	L	M	19,289	<LD	<LD	0,506
2	1	4	L	H	128,966	0,875	2,767	82,868
2	1	4	L	M	12,327	<LD	<LD	0,641

Tabla A.10 (cont.). Datos de concentración de Zn, Cd, Pb y Cu en peces (mg kg⁻¹)

M (1)	PM (2)	nº pez	Especie (3)	Tejido (4)	Zn	Cd	Pb	Cu
2	1	5	L	B	45,930	<LD	1,057	2,767
2	1	5	L	B	55,492	<LD	0,638	3,799
2	1	5	L	H	117,821	1,726	2,672	901,363
2	1	5	L	M	15,207	<LD	<LD	1,809
2	1	6	L	B	58,673	<LD	15,295	3,446
2	1	6	L	M	19,921	<LD	0,345	0,559
2	1	8	L	B	50,118	<LD	0,247	2,835
2	1	8	L	H	111,116	1,101	2,105	1492,310
2	1	8	L	M	16,974	<LD	<LD	1,164
2	1	9	L	B	55,630	<LD	0,395	4,369
2	1	9	L	M	12,741	<LD	<LD	0,500
2	1	10	L	B	50,498	<LD	2,217	3,245
2	1	10	L	H	100,149	0,822	4,025	317,947
2	1	10	L	M	21,299	<LD	<LD	0,756
2	1	11	L	B	50,134	<LD	0,500	3,298
2	1	11	L	H	96,778	0,784	2,053	433,891
2	1	11	L	M	13,312	<LD	<LD	0,980
2	1	12	L	B	59,747	<LD	1,673	3,156
2	1	12	L	M	17,825	<LD	<LD	0,279
2	1	13	L	B	54,058	<LD	0,385	3,626
2	1	13	L	H	96,830	0,646	2,112	394,168
2	1	13	L	M	15,369	<LD	<LD	0,684
2	1	14	S	B	82,099	<LD	2,949	1,880
2	1	14	S	H	127,750	0,933	1,063	11,872
2	1	14	S	M	15,972	<LD	<LD	1,234
2	1	15	L	B	62,885	<LD	0,287	3,226
2	1	15	L	H	98,998	0,804	2,866	51,154
2	1	15	L	M	20,285	<LD	<LD	0,599
2	1	17	L	B	52,872	<LD	0,783	2,994
2	1	17	L	H	157,364	2,898	6,970	640,635
2	1	17	L	M	13,957	<LD	<LD	0,3586
2	2	3	L	B	68,201	0,111	0,662	3,196
2	2	3	L	H	140,746	1,249	2,059	635,561
2	2	3	L	M	12,667	<LD	<LD	0,412

Tabla A.10 (cont.). Datos de concentración de Zn, Cd, Pb y Cu en peces (mg kg⁻¹)

M (1)	PM (2)	nº pez	Especie (3)	Tejido (4)	Zn	Cd	Pb	Cu
2	2	4	L	B	55,671	<LD	<LD	2,220
2	2	4	L	M	20,573	<LD	<LD	0,606
2	2	5	L	B	64,774	<LD	0,759	3,028
2	2	5	L	M	12,499	<LD	<LD	0,347
2	3	3	L	B	60,881	0,103	2,255	31,834
2	3	3	L	H	72,384	0,671	5,122	335,101
2	3	3	L	M	13,211	<LD	<LD	2,140
2	3	6	Ru	B	63,400	<LD	0,845	1,466
2	3	6	Ru	H	101,473	0,298	0,932	9,962
2	3	6	Ru	M	22,778	<LD	<LD	0,666
2	3	7	Ru	B	65,961	<LD	1,559	3,187
2	3	7	Ru	H	125,365	0,073	0,125	18,440
2	3	7	Ru	M	19,048	<LD	<LD	1,644
2	3	8	Ru	B	71,938	<LD	1,061	8,558
2	3	8	Ru	M	21,4588	<LD	<LD	2,186
2	3	8	Ru	M	259,842	0,399	1,061	NC
2	3	9	Ru	B	66,753	<LD	0,757	2,220
2	3	9	Ru	H	113,631	0,079	0,078	12,517
2	3	9	Ru	M	23,805	<LD	<LD	1,031
2	3	10	Ru	B	67,030	<LD	2,147	2,128
2	3	10	Ru	H	116,75	0,14	1,34	15,10
2	3	10	Ru	M	14,436	<LD	<LD	1,284
2	3	11	Ru	B	56,848	<LD	4,114	3,090
2	3	11	Ru	H	125,183	0,281	0,597	14,388
2	3	11	Ru	M	17,468	<LD	<LD	2,478
2	3	12	Ru	B	62,767	<LD	1,591	2,191
2	3	12	Ru	H	97,836	0,169	0,603	9,516
2	3	12	Ru	M	14,996	<LD	<LD	1,381
2	3	13	Ru	B	71,797	<LD	1,682	6,841
2	3	13	Ru	H	177,194	0,184	<LD	51,029
2	3	13	Ru	M	20,832	<LD	<LD	0,740
2	3	14	Ru	B	73,415	<LD	1,895	3,603
2	3	14	Ru	H	249,973	0,180	0,521	70,547
2	3	14	Ru	M	14,116	<LD	<LD	0,856

Tabla A.10 (cont.). Datos de concentración de Zn, Cd, Pb y Cu en peces (mg kg⁻¹)

M (1)	PM (2)	nº pez	Especie (3)	Tejido (4)	Zn	Cd	Pb	Cu
2	3	15	Ru	B	65,271	<LD	1,133	3,199
2	3	15	Ru	H	92,711	0,118	0,240	9,783
2	3	15	Ru	M	19,525	<LD	<LD	1,696
2	3	16	Ru	B	70,120	<LD	4,190	4,226
2	3	16	Ru	H	135,259	0,430	0,411	15,673
2	3	16	Ru	M	16,293	<LD	<LD	0,597
2	3	17	Ru	B	67,088	<LD	1,013	2,534
2	3	17	Ru	H	119,112	0,185	0,282	19,914
2	3	17	Ru	M	16,339	<LD	<LD	0,885
2	4	2	L	B	59,477	0,111	0,469	9,868
2	4	2	L	H	86,835	1,253	1,483	168,429
2	4	2	L	M	20,058	0,096	<LD	10,137
2	5	1	L	B	151,471	0,518	1,357	34,082
2	5	1	L	H	114,970	0,506	5,028	104,495
2	5	1	L	M	16,976	<LD	0,168	2,097
2	5	3	L	B	73,622	<LD	0,511	3,082
2	5	3	L	H	126,994	1,217	7,555	158,963
2	5	3	L	M	19,018	<LD	<LD	0,675
3	1	1	L	B	50,011	<LD	0,530	6,276
3	1	1	L	H	90,126	0,940	2,800	242,985
3	1	1	L	M	32,280	<LD	<LD	1,200
3	1	3	L	H	99,835	0,414	5,731	793,926
3	1	3	L	M	15,865	<LD	<LD	0,504
3	1	4	L	B	68,204	<LD	1,923	2,928
3	1	4	L	H	142,131	1,972	4,125	82,081
3	1	4	L	M	14,132	<LD	<LD	0,641
3	1	6	L	B	43,333	<LD	0,578	10,760
3	1	6	L	M	15,816	<LD	0,205	0,804
3	1	7	L	B	46,117	<LD	0,869	3,749
3	1	7	L	H	100,609	1,449	7,706	365,713
3	1	7	L	M	22,131	<LD	0,181	0,833
3	1	8	Ra	B	73,647	<LD	1,163	1,956
3	1	8	Ra	B	58,847	<LD	1,159	4,222
3	1	8	Ra	H	160,771	2,159	1,507	50,576
3	1	8	Ra	M	32,970	<LD	<LD	0,750

Tabla A.10 (cont.). Datos de concentración de Zn, Cd, Pb y Cu en peces (mg kg⁻¹)

M (1)	PM (2)	nº pez	Especie (3)	Tejido (4)	Zn	Cd	Pb	Cu
3	1	9	Ru	B	1152,539	<LD	<LD	2,580
3	1	9	Ru	H	503,004	0,078	<LD	6,049
3	1	10	Ra	B	46,177	<LD	0,230	3,629
3	1	10	Ra	H	68,291	0,162	<LD	3,756
3	1	10	Ra	M	14,025	<LD	0,876	0,392
3	1	11	L	B	65,153	<LD	0,850	2,762
3	1	11	L	H	122,943	0,399	2,655	249,954
3	1	11	L	M	16,309	<LD	<LD	1,021
3	1	12	Ra	B	49,265	<LD	0,316	1,679
3	1	12	Ra	H	86,324	0,210	<LD	4,850
3	1	12	Ra	M	19,007	<LD	<LD	0,640
3	1	12	Ra	M	36,112	<LD	<LD	1,978
3	1	13	Ra	B	59,463	<LD	<LD	1,257
3	1	13	Ra	M	32,065	<LD	<LD	1,477
3	1	13	Ra	M	29,192	<LD	3,132	0,809
3	2	7	Ra	B	58,077	<LD	0,317	3,779
3	2	7	Ra	H	118,391	0,225	<LD	9,444
3	2	7	Ra	M	27,428	<LD	<LD	2,017
3	2	8	Ra	B	64,827	<LD	2,483	1,954
3	2	8	Ra	H	475,082	0,298	0,077	14,273
3	2	8	Ra	M	32,441	<LD	<LD	1,590
3	2	9	Ra	B	51,530	<LD	0,467	1,291
3	2	9	Ra	H	191,514	0,237	<LD	9,276
3	2	9	Ra	M	16,227	<LD	<LD	0,300
3	2	10	Ra	B	38,448	0,215	0,814	NC
3	2	10	Ra	H	292,195	3,830	0,833	28,466
3	3	1	Ru	B	70,934	<LD	0,804	1,568
3	3	1	Ru	M	29,524	<LD	<LD	1,664
3	3	3	L	H	84,458	0,847	4,177	332,776
3	3	3	L	M	16,886	<LD	0,197	0,798
3	3	4	L	B	74,304	<LD	4,771	3,321
3	3	4	L	H	130,942	<LD	0,964	150,643
3	3	4	L	M	29,557	<LD	<LD	0,743

Tabla A.10 (cont.). Datos de concentración de Zn, Cd, Pb y Cu en peces (mg kg⁻¹)

M (1)	PM (2)	nº pez	Especie (3)	Tejido (4)	Zn	Cd	Pb	Cu
3	3	5	Ru	B	<LD	<LD	<LD	<LD
3	3	5	Ru	H	165,587	2,529	0,594	28,092
3	3	5	Ru	M	24,326	<LD	0,333	0,546
3	3	6	L	B	38,729	<LD	7,061	23,225
3	3	6	L	H	67,536	0,152	1,423	426,230
3	3	6	L	M	13,900	<LD	<LD	0,654
3	3	7	L	B	66,893	<LD	1,672	2,956
3	3	7	L	H	143,549	0,502	0,310	80,199
3	3	7	L	M	<LD	<LD	LD	<LD
3	4	1	Ru	B	64,710	<LD	1,638	2,163
3	4	1	Ru	H	130,983	0,491	1,019	34,143
3	4	1	Ru	M	11,676	<LD	<LD	0,351
3	4	2	Ra	B	79,443	<LD	1,438	2,214
3	4	2	Ra	H	298,991	0,688	<LD	17,359
3	4	2	Ra	M	28,584	<LD	<LD	0,920
3	4	4	Ra	B	111,285	<LD	0,366	2,673
3	4	4	Ra	H	271,760	0,967	<LD	7,689
3	4	4	Ra	M	41,505	<LD	0,322	1,268
3	4	5	Ru	B	60,925	<LD	0,967	1,657
3	4	5	Ru	H	68,459	0,383	0,438	6,957
3	4	5	Ru	M	16,327	<LD	1,492	0,721
3	4	6	Ru	B	64,361	<LD	1,237	2,067
3	4	6	Ru	H	87,043	1,105	2,378	179,490
3	4	6	Ru	M	17,262	<LD	<LD	0,722
3	5	1	Ru	B	69,449	<LD	0,634	2,097
3	5	1	Ru	H	120,979	0,465	0,848	18,041
3	5	2	L	B	55,172	<LD	1,096	3,038
3	5	2	L	H	64,744	0,042	<LD	68,952
3	5	2	L	M	20,367	<LD	<LD	0,566
3	5	3	L	B	62,273	<LD	8,197	5,170
3	5	3	L	H	116,295	0,064	0,123	21,574
3	5	3	L	M	25,480	<LD	<LD	0,942
3	5	4	L	B	63,471	<LD	6,761	3,389
3	5	4	L	M	18,163	<LD	<LD	0,854

Tabla A.10 (cont.). Datos de concentración de Zn, Cd, Pb y Cu en peces (mg kg⁻¹)

M (1)	PM (2)	nº pez	Especie (3)	Tejido (4)	Zn	Cd	Pb	Cu
4	1	1	L	B	51,122	<LD	<LD	3,192
4	1	1	L	H	43,777	0,218	0,596	75,426
4	1	1	L	M	19,846	<LD	<LD	0,652
4	1	2	L	B	61,139	<LD	0,549	1,811
4	1	2	L	H	75,029	0,750	1,792	292,242
4	1	2	L	M	19,057	<LD	<LD	0,761
4	1	3	L	B	58,902	<LD	<LD	3,290
4	1	3	L	B	69,326	<LD	1,242	1,946
4	1	3	L	H	111,362	0,788	3,032	390,947
4	1	3	L	M	18,054	<LD	<LD	0,554
4	1	4	L	B	54,138	<LD	1,094	3,660
4	1	4	L	H	78,185	1,301	5,884	130,209
4	1	4	L	M	15,485	<LD	<LD	0,754
4	1	5	L	B	42,860	<LD	1,146	4,325
4	1	5	L	H	98,148	0,798	3,953	308,148
4	1	5	L	M	18,319	<LD	NC	0,457
4	1	6	L	B	5,890	<LD	0,817	0,547
4	1	6	L	H	145,286	1,105	2,678	123,981
4	1	6	L	M	13,451	<LD	<LD	0,492
4	1	7	L	B	52,298	<LD	0,390	2,245
4	1	7	L	H	17,414	0,064	0,301	23,221
4	1	7	L	M	21,743	<LD	<LD	0,846
4	1	9	Ra	B	54,087	<LD	0,187	2,328
4	1	9	Ra	H	344,875	0,451	<LD	25,438
4	1	9	Ra	M	18,860	<LD	<LD	0,591
4	1	10	S	B	112,475	<LD	20,126	2,605
4	1	10	S	H	142,681	2,431	5,698	16,404
4	1	10	S	M	32,927	<LD	0,936	1,138
4	2	2	S	B	80,672	<LD	4,629	2,927
4	2	2	S	H	157,890	3,262	1,549	22,991
4	2	2	S	M	23,261	<LD	<LD	0,332
4	2	3	S	B	68,528	<LD	1,110	1,201
4	2	3	S	H	71,898	0,396	0,624	10,876
4	2	3	S	M	46,581	<LD	<LD	0,346

Tabla A.10 (cont.). Datos de concentración de Zn, Cd, Pb y Cu en peces (mg kg⁻¹)

M (1)	PM (2)	nº pez	Especie (3)	Tejido (4)	Zn	Cd	Pb	Cu
4	4	1	L	B	95,083	<LD	0,207	3,135
4	4	1	L	H	65,393	0,343	2,559	262,219
4	4	1	L	M	16,747	<LD	<LD	0,397
4	4	2	L	B	57,592	<LD	<LD	3,310
4	4	2	L	H	13,710	<LD	0,424	22,308
4	4	4	Ru	B	66,769	<LD	0,344	2,897
4	4	4	Ru	H	128,383	0,554	1,363	20,410
4	4	4	Ru	M	22,718	<LD	<LD	0,645
4	4	9	Ra	B	75,306	<LD	2,308	2,138
4	4	9	Ra	H	160,527	1,213	<LD	27,059
4	4	9	Ra	M	26,716	<LD	0,431	0,408
4	4	10	Ra	B	110,452	<LD	<LD	1,392
4	4	10	Ra	M	19,981	<LD	<LD	0,821
4	4	11	Ra	B	91,547	<LD	0,187	1,443
4	4	11	Ra	H	215,470	1,733	<LD	13,457
4	4	11	Ra	M	20,070	<LD	<LD	0,693

⁽¹⁾ Muestreo⁽²⁾ Punto de muestreo: 1- Getares; 2- Isla Verde; 3- Palmones; 4- Guadarranque; 5-Puente Mayorga⁽³⁾ Especie: L: Lenguado; Ra: Rascacio; Ru: Rubio; S: Sargo⁽⁴⁾ Tejido: B: Branquias; H: Hígado; Músculo

<LD: Dato por debajo del límite de detección

NC: Dato determinado pero no considerado

Referencias

Abbasi S., Bahiraei A., Abbasai F. "A highly sensitive method for simultaneous determination of ultra trace levels of copper and cadmium in food and water samples with luminol as a chelating agent by adsorptive stripping voltammetry". *Food Chemistry* 129, 1274-1280 (2011).

Abbasi S. y Bahiraei A. "Ultra trace quantification of chromium(VI) in food and water samples by highly sensitive catalytic adsorptive stripping voltammetry with rubeanic acid". *Food Chemistry* 133, 1075-1080 (2012).

Abboud P. y Wilkinson K.J. "Role of metal mixtures (Ca, Cu and Pb) on Cd bioaccumulation and phytochelatin production by *Chlamydomonas reinhardtii*". *Environmental Pollution* 179, 33-38 (2013).

Abdallah M.A.M. "Chemical speciation and contamination assessment of Pb and V by sequential extraction in surface sediment off Nile Delta, Egypt". *Arabian Journal of Chemistry* (Article in Press) (2012).

Abebe F.A., Eribal C.S., Ramakrishna G., Sinn E. "A 'turn-on' fluorescent sensor for the selective detection of cobalt and nickel ions in aqueous media". *Tetrahedron Letters* 52, 5554-5558 (2011).

Abergel R.J. y Raymond K.N. "Synthesis and thermodynamic evaluation of mixed hexadentate linear iron chelators containing hydroxypyridinone and terephthalamide units". *Inorganic Chemistry* 45, 3622-3631 (2006).

Abollino O., Aceto M., Bruzzoniti M.C., Mentasti E., Sarzanini C. "Determination of metals in highly saline matrices by solid-phase extraction and slurry-sampling inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry". *Analytica Chimica Acta* 375, 293-298 (1998).

Abraham G.M.S. y Parker R.J. "Assessment of heavy metal enrichment factors and the degree of contamination in marine sediments from Tamaki Estuary, Auckland, New Zealand". *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 136, 227-238 (2008).

Actualización del Diagnóstico Ambiental de Algeciras. Agenda Local 21 de Algeciras. Ilustre Ayuntamiento de Algeciras, en colaboración con NERSAL SOLUCIONES S.L. (Algeciras, Octubre 2010) (<http://www.algeciras.es/imagenesPortada/DIAM2010.pdf>)

- Adamo** P. y Zampella M. "Chapter 9 – Chemical speciation to assess potentially toxic metals' (PTM's) bioavailability and geochemical forms in polluted soils". *Environmental Geochemistry*, 175-212 (2008).
- Aguilar** M. y Cortina J. L. "Solvent Extraction and Liquid Membranes. Fundamentals and Applications in New Materials". CRC Press, Taylor & Francis Group, London New York (2008).
- Aguilera-Colmenero** A. "Peces de la Costa Brava: 43 especies de nuestras costas". Editor: Lulu.com (2009).
- Ahmad** A.L., Kusumastuti A., Derek C.J.C., Ooi B.S. "Emulsion liquid membrane for heavy metal removal: An overview on emulsion stabilization and destabilization". *Chemical Engineering Journal* 171, 870-882 (2011).
- Ahmad** A.L., Kusumastuti A., Derek C.J.C., Ooi B.S. "Emulsion liquid membrane for cadmium removal: Studies on emulsion diameter and stability". *Desalination* 287, 30-34 (2012).
- Ahuja** S. "Arsenic contamination of groundwater: mechanism, analysis, and remediation". Ed. John Wiley & Sons (United States of America) (2008).
- Akama** Y., Yamada K., Itoh O. "Solid phase extraction of lead by Chelest Fiber Iry (aminopolycarboxylic acid-type cellulose)". *Analytica Chimica Acta* 485, 19-24 (2003).
- Akin** I., Erdemir S., Yilmaz M., Ersoz M. "Calix[4]arene derivative bearing imidazole groups as carrier for the transport of palladium by using bulk liquid membrane". *Journal of Hazardous Materials* 223-224, 24-30 (2012).
- Aksuner** N., Henden E., Yilmaz I., Cukurovali A. "A highly sensitive and selective fluorescent sensor for the determination of copper(II) based on a schiff base". *Dyes and Pigments* 83, 211-217 (2009).
- Alagarsamy** R. "Distribution and seasonal variation of trace metals in surface sediments of the Mandovi estuary, west coast of India". *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 67, 333-339 (2006).
- Albani** J.R. "Structure and dynamics of macromolecules: Absorption and Fluorescence studies". Elsevier (2004).
- Alegret** S., del Valle M., Merkoçi A. "Sensores electroquímicos". Servicio de Publicaciones de la Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Química. Grupo de Sensores y Biosensores (2004).
- Alguacil** F.J., Alonso M., Sastre A.M. "Facilitated supported liquid membrane transport of gold(I) and gold(III) using Cyanex® 921". *Journal of Membrane Science* 252, 237-244 (2005a).
- Alguacil** F.J. y Alonso M. "Description of transport mechanism during the elimination of copper(II) from wastewaters using supported liquid membranes and Acorga M5640 is carrier". *Environmental Science and Technology* 39, 2389-2393 (2005b).
- Alguacil** F.J. y Tayibi H. "Carrier-facilitated transport of Cd(II) from a high-salinity chloride medium across a supported liquid membrane containing Cyanex 923 in Solvesso 100". *Desalination* 180, 181-187 (2005c).

- Alguacil** F.J., Alonso M., López F.A., López-Delgado A. "Active transport of cobalt(II) through a supported liquid membrane using the mixture DP8R and Acorga M5640 as extractant". *Desalination* 281, 221-225 (2011).
- Ali** I. y Aboul-Enein H.Y. "Instrumental Methods in Metal Ions Speciation". Taylor & Francis Ltd., New York, USA (2006).
- Alomar** K., Landreau A., Allain M., Bouet G., Larcher G. "Synthesis, structure and antifungal activity of thiophene-2,3- dicarboxaldehyde bis(thiosemicarbazone) and nickel(II), copper(II) and cadmium(II) complexes: Unsymmetrical coordination mode of nickel complex". *Journal of Inorganic Biochemistry* 126, 76-83 (2013).
- Alonso** E., Santos A., Callejón M., Jiménez J.C. "Speciation as a screening tool for the determination of heavy metal surface water pollution in the Guadamar river basin". *Chemosphere* 56, 561-570 (2004).
- Alonso-Castillo** M.L., Sánchez-Trujillo I., Vereda-Alonso E., García-de Torres A., Cano-Pavón J.M. "Bioavailability of heavy metals in water and sediments from a typical Mediterranean Bay (Málaga Bay, Region of Andalucía, Southern Spain)". *Marine Pollution Bulletin* (Article in Press) (2013).
- Alpaydin** S., Saf A.O., Bozkurt S., Sirit A. "Kinetic study on removal of toxic metal Cr(VI) through a bulk liquid membrane containing p-tert-butylcalix[4]arene derivative". *Desalination* 275, 166-171 (2011).
- Al-Sayah** M.H. y El-Chami T.M. "Spectroscopic studies on a 'turn-on' fluorescent sensor for transition metals with selective 'turn-off' for mercury(II) ions". *Supramolecular Chemistry* 21, 650-657 (2009).
- Altin** S., Yildirim Y., Altin A. "Transport of silver ions through a flat-sheet supported liquid membrane". *Hydrometallurgy* 103, 144-149 (2010).
- Altntop** M.D., Özdemir A., Turan-Zitouni G., Ilgn S., Atl Ö., Işcan G., Kaplancl Z.A. "Synthesis and biological evaluation of some hydrazone derivatives as new anticandidal and anticancer agents". *European Journal of Medicinal Chemistry* 58, 299-307 (2012).
- Álvarez-Ayuso** E., García-Sánchez A., Querol X., Moyano A. "Trace element mobility in soils seven years after the Aznalcóllar mine spill". *Chemosphere* 73, 1240-1246 (2008).
- An** J.-M., Yan M.-H., Yang Z.-Y., Li T.-R., Zhou Q.-X. "A turn-on fluorescent sensor for Zn(II) based on fluorescein-coumarin conjugate". *Dyes and Pigments* 99, 1-5 (2013).
- Anagnostou** C., Kaberi H., Karageorgis A. "Environmental impact on the surface sediments of the bay and the gulf of Thessaloniki (Greece) according to the geoaccumulation index classification". *International Conference on Water Pollution Proceedings*, 269-275 (1997).
- Anitha** P., Chitrapriya N., Jang Y.J., Viswanathamurthi P. "Synthesis, characterization, DNA interaction, antioxidant and anticancer activity of new ruthenium(II) complexes of thiosemicarbazone/semicarbazone bearing 9,10-phenanthrenequinone". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 129, 17-26 (2013).

- Annibaldi A.**, Truzzi C., Illuminati S., Scarponi G. "Recent sudden decrease of lead in Adriatic coastal seawater during the years 2000-2004 in parallel with the phasing out of leaded gasoline in Italy". *Marine Chemistry* 113, 238-249 (2009).
- Annibaldi A.**, Illuminati S., Truzzi C., Scarponi G. "SWASV speciation of Cd, Pb and Cu for the determination of seawater contamination in the area of the Nicole shipwreck (Ancona coast, Central Adriatic Sea)". *Marine Pollution Bulletin* 62, 2813-2821 (2011).
- Ansari S.A.**, Mohapatra P.K., Prabhu D.R., Manchanda V.K. "Transport of Americium(III) through a supported liquid membrane containing N,N,N',N'-tetraoctyl-3-oxapentane diamide (TODGA) in n-dodecane as the carrier". *Journal of Membrane Science* 282, 133-141 (2006).
- Anthemidis A.N.** "Automatic sequential injection liquid-liquid micro-extraction system for on-line flame atomic absorption spectrometric determination of trace metal in water samples". *Talanta* 77, 541-545 (2008).
- Antholine W.**, Knight J., Whelan H., Petering D. "Studies of the reaction of 2-formylpyridine thiosemicarbazone and its iron and copper complexes with biological systems". *Molecular Pharmacology* 13, 89-98 (1977).
- Aouarram A.**, Galindo-Riano M.D., Garcia-Vargas M., Stitou M., El Yousfi F. "A permeation liquid membrane system for determination of nickel in seawater". *Talanta* 71, 165-170 (2007).
- Apostoli P.**, Cornelis R., Duffus J., Hoet P., Lison D., Templeton D. "Elemental speciation in human health risk assessment". *Environmental health criteria* 234. Ed. World Health Organization (WHO) (2006).
- Araki T.** y Tsukube H. "Liquid Membranes: Chemical Applications". CRC Press, Florida (1990).
- Arancibia V.**, Nagles E., Cornejo S. "Determination of lead in the presence of morin-5'-sulfonic acid and sodium dodecyl sulfate by adsorptive stripping voltammetry". *Talanta* 80, 184-188 (2009).
- Araújo C.V.M.**, Diz F.R., Laiz I., Lubián L.M., Blasco J., Moreno-Garrido, I. "Sediment integrative assessment of the Bay of Cádiz (Spain): An ecotoxicological and chemical approach". *Environment International* 35, 831-841 (2009).
- Araújo C.V.M.**, Diz F.R., Tornero V., Lubián L.M., Blasco, J., Moreno-Garrido, I. "Ranking sediment samples from three Spanish estuaries in relation to its toxicity for two benthic species: the microalga *Cylindrotheca closterium* and the copepod *Tisbe battagliai*". *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 393-400 (2010).
- Arellano J.M.** y Sarasquete C. "Atlas histológico del lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup, 1858)". Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España, I.S.B.N.:84-00-08389-X (2005).
- Argekar A.P.** y Shetty A.K. "Extraction of lead(II) with cyanex 302 and its spectrophotometric determination with PAR". *Talanta* 45, 909-915 (1998).
- Armstrong K.C.**, Tatum C.E., Dansby-Sparks R.N., Chambers J.Q., Xue Z.-L. "Individual and simultaneous determination of lead, cadmium, and zinc by anodic stripping voltammetry at a bismuth bulk electrode". *Talanta* 82, 675-680 (2010).

- Arous O.**, Amara M., Trari M., Bouguelia A., Kerdjoudj H. "Cadmium(II) and lead(II) transport in a polymer inclusion membrane using tributyl phosphate as mobile carrier and CuFeO_2 as a polarized photo electrode". *Journal of Hazardous Materials* 180, 493-498 (2010).
- Arslan G.**, Tor A., Cengeloglu Y., Ersoz M. "Facilitated transport of Cr(III) through activated composite membrane containing di-(2-ethylhexyl)phosphoric acid (DEHPA) as carrier agent". *Journal of Hazardous Materials* 165, 729-735 (2009a).
- Arslan G.**, Tor A., Muslu H., Ozmen M., Akin I., Cengeloglu Y., Ersoz M. "Facilitated transport of Cr(VI) through a novel activated composite membrane containing Cyanex 923 as a carrier". *Journal of Membrane Science* 337, 224-231 (2009b).
- Artolachi A.** y Calvo Cubero J. "El litoral de la provincia de Cádiz. Manual para el profesor". Ed. Junta de Andalucía – Consejería de Medio Ambiente, Sevilla (2006).
- Asadullah M.N.** y Chaudhury N. "Poisoning the mind: Arsenic contamination of drinking water wells and children's educational achievement in rural Bangladesh". *Economics of Education Review* 30, 873-888 (2011).
- Asociación de Grandes Industrias en el Campo de Gibraltar** (<http://www.agicg.es/>)
- Ata O.N.**, Beşe A.V., Çolak S., Dönmez B., Çakici A. "Effects of parameters on the transport of zinc ion through supported liquid membrane". *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 43, 895-903 (2004).
- Ata O.N.** "Modelling of copper ion transport through supported liquid membrane containing LIX 984". *Hydrometallurgy* 77, 269-277 (2005).
- Attimarad M.**, Mueen Ahmed K.K., Aldhubaib B.E., Harsha S. "High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery". *Pharmaceutical Methods Issue* 2, 71-75 (2011).
- Aucoin J.**, Blanchard R., Billiot C., Partridge C., Shultz D., Mandhare K., Beck M.J., Beck J.N. "Trace Metals in fish and sediments from Lake Boeuf Southeastern Louisiana". *Microchemical Journal*, 62, 299-307 (1999).
- Aydin Z.**, Wei Y., Guo M. "A highly selective rhodamine based turn-on optical sensor for Fe^{3+} ". *Inorganic Chemistry Communications* 20, 93-96 (2012).
- Azcue J.M.** "Metales en Sistemas Biológicos: Metales en el medio Ambiente". Ed. PPU, Barcelona (1993).
- Azzoug S.**, Arous O., Kerdjoudj H. "Metallic ions extraction and transport in supported liquid membrane using organo-phosphoric compounds as mobile carriers". *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2, 154-162 (2014).
- Bae S.Y.**, Zeng X., Murray G.M. "Photometric method for the determination of Pb^{2+} following separation and preconcentration using a templated ion-exchange resin". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13, 1177-1180 (1998).
- Baeyens W.**, Montey F., Leermakers M., Bouillon S. "Evaluation of sequential extractions on dry and wet sediments". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376, 890-901 (2003).

- Baig** J.A., Kazi T.G., Arain M.B., Shah A.Q., Sarfraz R.A., Afridi H.I., Kandhro G.A., Jamali M.K., Khan S. "Arsenic fractionation in sediments of different origins using BCR sequential and single extraction methods". *Journal of Hazardous Materials* 167, 745-751 (2009).
- Bailey** R.A., Clark H.M., Ferris J.P., Krause S., Strong R.L. "Chapter 11 – Water systems and water treatment". *Chemistry of the Environment (Second Edition)*, 415-442 (2002).
- Baird** C. y Cann M. "Environmental chemistry" (Third Edition)". New York: W.H. Freeman (2005).
- Baldo** M.A., Bragato C., Mazzocchin G.A., Daniele S. "Lead and copper deposition from dilute solutions onto carbon disc microelectrodes. Assessment of quantification procedures by anodic stripping voltammetry". *Electrochimica Acta* 43, 3413-3422 (1998).
- Bale** M.N., Dave D.P., Sawant A.D. "Extraction and spectrophotometric determination of lead(II) with pyridine-2-acetaldehyde salicyloylhydrazone". *Talanta* 42, 1291-1296 (1995).
- Balistrieri** L.S. y Mebane C.A. "Predicting the toxicity of metal mixtures". *Science of the Total Environment* 466-467, 788-799 (2014).
- Balls** P.W., Laslett R.E., Price N.B. "Nutrient and trace metal distributions over a complete semi-diurnal tidal cycle in the forth estuary, Scotland". *Netherlands Journal of Sea Research* 33, 1-17 (1994).
- Bansal** B., Chen X.D., Hossain Md.M. "Transport of lithium through a supported liquid membrane of LIX54 and TOPO in kerosene". *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 44, 1327-1336 (2005).
- Barbeira** P.J.S. y Stradiotto N.R. "Simultaneous determination of trace amounts of zinc, lead and copper in rum by anodic stripping voltammetry". *Talanta* 44, 185-188 (1997).
- Barchowsky** A. "Metals and Cardiovascular Disease" en "Comprehensive Toxicology" (Second Edition). Volume 6: *Cardiovascular Toxicology*, 447-463 (2010).
- Barrero-Moreno** J.M. "Desarrollo, evaluación y caracterización de fases reactivas sensibles a diferentes analitos y su empleo en sensores ópticos en flujo". Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Analítica. (Madrid, 1994).
- Bartsch** R.A. y Way J.D. "Chemical Separations with Liquid Membranes", *ACS Symposium Series*, 642, American Chemical Society, Washington D.C (1996).
- Batista** B.L., Rodrigues J.L., De Souza S.S., Oliveira Souza V.C., Barbosa Jr. F. "Mercury speciation in seafood samples by LC-ICP-MS with a rapid ultrasound-assisted extraction procedure: Application to the determination of mercury in Brazilian seafood samples". *Food Chemistry* 126, 2000-2004 (2011).
- Batley** G.E. "Speciation of heavy metals in water, sediments and biota of the Macquerie lake". *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 38, 591-606 (1987).
- Batley** G.E., Apte S.C., Stauber J.L. "Speciation and bioavailability of trace metals in water: Progress since 1982". *Australian Journal of Chemistry* 57, 903-919 (2004).

- Batterham** G.J., Munksgaard N.C., Parry D.L. "Determination of trace metals in seawater by inductively coupled plasma mass spectrometry after off-line dithiocarbamate solvent extraction". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 12, 1277-1280 (1997).
- Bautista** J.L., Flores-Alamo M., Tiburcio J., Vieto R., Torrens H. "Synthesis and structural characterization of fluorinated thiosemicarbazones". *Molecules* 18, 13111-13123 (2013).
- Bayen** S., Worms I., Parthasarathy N., Wilkinson K., Buffle J. "Cadmium bioavailability and speciation using the permeation liquid membrane". *Analytica Chimica Acta* 575, 267-273 (2006).
- Bayen** S., Gunkel-Grillon P., Worms, I. Martin, M. Buffle, J. "Influence of inorganic complexes on the transport of trace metals through permeation liquid membrane". *Analytica Chimica Acta* 646, 104-110 (2009).
- Bayou** N., Arous O., Amara M., Kerdjoudj H. "Elaboration and characterisation of a plasticized cellulose triacetate membrane containing trioctylphosphine oxyde (TOPO): Application to the transport of uranium and molybdenum ions". *Comptes Rendus Chimie* 13, 1370-1376 (2010).
- Beckett** R. y Ranville J. "Chapter 17: Natural organic matter". *Interface Science and Technology* 10 (C), 299-315 (2006).
- Belabed** B.-E., Laffray X., Dhib A., Fertouna-Belakhal M., Turki S., Aleya L. "Factors contributing to heavy metal accumulation in sediments and in the intertidal mussel *Perna perna* in the Gulf of Annaba (Algeria)". *Marine Pollution Bulletin* 74, 477-489 (2013).
- Belicchi-Ferrari** M., Bisceglie F., Pelosi G., Pinelli S., Tarasconi P. "Synthesis, characterization, crystal structure and antiproliferative in vitro activity of long-chain aliphatic thiosemicarbazones and their Ni(II) complexes". *Polyhedron* 26, 5150-5161 (2007).
- Belkhouche** N.E., Didi M.A., Romero R., Jönsson J.A., Villemin D. "Study of new organophosphorus derivatives carriers on the selective recovery of M(II) and M(III) metals, using supported liquid membrane extraction". *Journal of Membrane Science* 284, 398-405 (2006).
- Bender-Koch** C., Rasmussen H.K., Mørup S. "Iron speciation in natural hyperacid water investigated by Mössbauer spectroscopy". *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 74, 928-930 (2009).
- Benjamin** M.M. y Honeyman B.D. "Chapter 15 – Trace metals". *International Geophysics*, 377-418 (2000).
- Benosmane** N., Hamdi S.M., Hamdi M., Boutemour B. "Selective transport of metal ions across polymer inclusion membranes (PIMs) containing calix[4]resorcinarenes". *Separation and Purification Technology* 65, 211-219 (2009).
- Bergeron** R.J., Huang G., Smith R.E., Bharti N., McManis J.S., Butler A. "Total synthesis and structure revision of petrobactin". *Tetrahedron* 59, 2007-2014 (2003).
- Berhe** H.G., Bourne S.A., Bredenkamp M.W., Esterhuysen C., Habtu M.M., Koch K.R., Luckay R.C. "High and selective Ag(I) bulk liquid membrane transport with N,N-diethyl-N'-camphanyl thiourea and structure of the complex". *Inorganic Chemistry Communications* 9, 99-102 (2006).

- Berkowitz** B., Dror I., Yaron B. "Contaminant Geochemistry. Interactions and transport in the subsurface environment". Ed. Springer-Verlag (Alemania) (2008).
- Bernal** J.P., Rodriguez De San Miguel E., Aguilar J.C., Salazar G., De Gyves J. "Adsorption of metallic cations on silica gel-immobilized 8-hydroxyquinoline". *Separation Science and Technology* 35, 1661-1679 (2000).
- Besser** J.M., Brumbaugh W.G., May T.W., Ingersoll C.G. "Effects of organic amendments on the toxicity and bioavailability of cadmium and copper in spiked formulated sediments". *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 805-815 (2003).
- Bhakta** J.N. y Muneke Y. "Role of ecosystem components in Cd removal process of aquatic ecosystem". *Ecological Engineering* 32, 274-280 (2008).
- Bhardwaj** V.K., Pannu A.P.S., Singh N., Hundal M.S., Hundal G. "Synthesis of new tripodal receptors - a 'PET' based 'off-on' recognition of Ag^+ ". *Tetrahedron* 64, 5384-5391 (2008).
- Bhattacharyya** A., Mohapatra P.K., Gadly T., Raut D.R., Ghosh S.K., Manchanda V.K. "Liquid-liquid extraction and flat sheet supported liquid membrane studies on Am(III) and Eu(III) separation using 2,6-bis(5,6-dipropyl-1,2,4-triazin-3-yl)pyridine as the extractant". *Journal of Hazardous Materials* 195, 238-244 (2011).
- Bhowal** A., Bhattacharyya G., Inturu B., Datta S. "Continuous removal of hexavalent chromium by emulsion liquid membrane in a modified spray column". *Separation and Purification Technology* 99, 69-76 (2012).
- Bindu** P., Kurup M.R.P., Satyakeerty T.R. "EPR, cyclic voltammetric and biological activities of copper(II) complexes of salicylaldehyde N(4)-substituted thiosemicarbazone and heterocyclic bases". *Polyhedron* 18, 321-331 (1998).
- Bjerregaard** P. y Andersen O. "Chapter 13 – Ecotoxicology of Metals - Sources, Transport, and Effects in the Ecosystem". *Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition)*, 251-280 (2007).
- Boletín Hidrológico**. Datos de los valores de precipitación recogidos por los pluviómetros del Boletín Hidrológico. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Gobierno de España (<http://servicios2.marm.es/sia/visualizacion/descargas/series.jsp>)
- Bonfant** L. y colaboradores. "Chapter 10 Solvent extraction". *Journal of Chromatography Library* 65, 287-339 (2002).
- Bonfil** Y. y Kirowa-Eisner E. "Determination of nanomolar concentrations of lead and cadmium by anodic-stripping voltammetry at the silver electrode". *Analytica Chimica Acta* 457, 285-296 (2002).
- Bordini** J., Calandrelli I., Silva G.O., Ferreira K.Q., Leitão-Mazzi D.P.S., Espreafico E.M., Tfouni E. "A rhodamine-B-based turn-on fluorescent sensor for biological iron(III)". *Inorganic Chemistry Communications* 35, 255-259 (2013).
- Bosserhoff** A. y Hellerbrand C. "Chapter 5 - Capillary Electrophoresis". *Molecular Diagnostics (Second Edition)*, 59-73 (2010).

- Boudaya** L. "Ecobiologie de deux espèces de Triglidae (Pisces, Teleostei) du golfe de Gabes: *Trigloporus lastoviza* (Bonnaterre, 1788) and *Aspitrigla obscura* (Linnaeus, 1764). D. E. A. Faculté des Sciences de Sfax. Université de Sfax, Tunisia (2000).
- Bourgeault** A., Ciffroy P., Garnier C., Cossu-Leguille C., Masfaraud J.-F., Charlatchka R., Garnier J.-M. "Speciation and bioavailability of dissolved copper in different freshwaters: Comparison of modelling, biological and chemical responses in aquatic mosses and gammarids". *Science of the Total Environment* 452-453, 68-77 (2013).
- Bozkurt** S.S., Ayata S., Kaynak I. "Fluorescence-based sensor for Pb(II) using tetra-(3-bromo-4-hydroxyphenyl)porphyrin in liquid and immobilized medium". *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 72, 880-883 (2009).
- Brajter** K., Olbrych-Śleszyńska E., Staśkiewicz M. "Preconcentration and separation of metal ions by means of amberlite XAD-2 loaded with pyrocatechol violet". *Talanta* 35, 65-67 (1988).
- Brand** M., Eshkenazi I., Kirowa-Eisner E. "The Silver Electrode in Square-Wave Anodic Stripping Voltammetry. Determination of Pb^{2+} without Removal of Oxygen". *Analytical Chemistry* 69, 4660-4664 (1997).
- Bravo-Sánchez** L.R., De La Riva B.S.V., Costa-Fernández J.M., Pereiro R., Sanz-Medel A. "Determination of lead and mercury in sea water by preconcentration in a flow injection system followed by atomic absorption spectrometry detection". *Talanta* 55, 1071-1078 (2001).
- Bricker** O.P. y Jones B.F. "Main factors affecting the composition of natural waters". En *"Trace Elements in Natural Waters"*. CRC Press, Boca Raton (Florida, United States of America) (1995).
- Broekaert** J.A.C. y Siemens V. "Recent trends in atomic spectrometry with microwave-induced plasmas". *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 59, 1823-1839 (2004).
- Brown** P.L. y Markich S.J. "Evaluation of the free ion activity model of metal-organism interaction: Extension of the conceptual model". *Aquatic Toxicology* 51, 177-194 (2000).
- Bruland** K.W. "Trace elements in seawater"; en: Riley J.P., Chester R. (Eds.) "Chemical Oceanography". Ed. Academic Press (Elsevier) (1983).
- Buchman** M.F. "NOAA Screening Quick Reference Tables", NOAA OR&R Report 08-1. Seattle WA, Office of Response and Restoration Division, National Oceanic and Atmospheric Administration, 34 pages (2008).
- Bukhari** N., Chaudry M.A., Mazhar M. "Cobalt(II) transport through triethanolamine-cyclohexanone supported liquid membranes". *Journal of Membrane Science* 234, 157-165 (2004).
- Burguera** J.L. y Burguera M. "Recent on-line processing procedures for biological samples for determination of trace elements by atomic spectrometric methods". *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 64, 451-458 (2009).
- Burlakovs** J., Kļaviņš M., Osinska L., Purmalis O. "The impact of humic substances as remediation agents to the speciation forms of metals in soil". *APCBEE Procedia* 5, 192-196 (2013).
- Burton** G.A. "Sediment quality criteria in use around the world" *Limnology* 3, 65-75 (2002).

- Calace** N., Casagrande A., Mirante S., Petronio B.M., Pietroletti M. "Distribution of humic substances dissolved and particulated in water column in Ross Sea, Antarctica". *Microchemical Journal* 96, 218-224 (2010).
- Caldecott** J. "Agua: ecología de una crisis global". Traducción de Joan Lluís Riera. Ed. Los Libros del Lince (Barcelona) (2011).
- Calero**, J.R. "Régimen Jurídico de las Costas Españolas". Ed. Aranzadi (1995).
- Callan** J.F., De Silva A.P., Magri D.C. "Luminescent sensors and switches in the early 21st century". *Tetrahedron* 61, 8551-8588 (2005).
- Callender** E. y Rice K.C. "The urban environmental gradient: Anthropogenic influences on the spatial and temporal distributions of lead and zinc in sediments". *Environmental Science and Technology* 34, 232-238 (2000).
- Cámara de comercio del Campo de Gibraltar**: "Catálogo de zonas industriales del Campo de Gibraltar" (http://www.camaracampodegibraltar.com/zonas_industriales/catalogo.html).
- Cámara** C., Fernández P., Martín-Esteban A., Pérez-Conde C., Vidal M. "Toma y tratamiento de muestras". Primera edición, primera reimpresión. Editorial Síntesis (Madrid) (2004).
- Cámara** C. y Pérez-Conde C. "Análisis químico de trazas". Editorial Síntesis (Madrid) (2011).
- Camilión** M.C., Manassero M.J., Hurtado M.A., Ronco A.R. "Copper, Lead and Zinc distribution in soils and sediments of the South Western coast of the Río de la Plata estuary". *Journal of Soils and Sediments* 3, 213-220 (2003).
- Campbell** P.G.C., Errécalde O., Fortín C., Hiriart-Baer V.P., Vigneult B. "Metal bioavailability to phytoplankton. Applicability of the biotic ligand model". *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology* 133, 189-206 (2002).
- Canadian Sediment Quality Guidelines** for the protection of Aquatic life. *Canadian Council of Ministers of Environment* (2002).
- Cao** Q.-Y., Han Y.-M., Wang H.-M., Xie Yu. "A new pyrenyl-appended triazole for fluorescent recognition of Hg^{2+} ion in aqueous solution". *Dyes and Pigments* 99, 798-802 (2013).
- Carasek** E., Wick Tonjes J., Scharf M. "A new method of microvolume back-extraction procedure for enrichment of Pb and Cd and determination by flame atomic absorption spectrometry". *Talanta* 56, 185-191 (2002).
- Carletto** J.S., Luciano R.M., Bedendo G.C., Carasek E. "Simple hollow fiber renewal liquid membrane extraction method for pre-concentration of Cd(II) in environmental samples and detection by Flame Atomic Absorption Spectrometry". *Analytica Chimica Acta* 638, 45-50 (2009).
- Carrasco** M., López-Rámirez J.A., Benavente J., López-Aguayo F., Sales D. "Assessment of urban and industrial contamination levels in the bay of Cádiz, SW Spain". *Marine Pollution Bulletin* 46, 335-345 (2003).
- Caruso** J.A., Klaue B., Michalke B., Rocke D.M. "Group assessment: elemental speciation". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 32-44 (2003).

- Casado-Martínez** M.C., Beiras R., Belzunce M.J., González-Castromil M.A., Marín-Guirao L., Postma J.F., Riba I., DelValls T.A. "Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. IV: Whole sediment toxicity test using crustacean amphipods". *Ciencias Marinas* 32, 149-157 (2006).
- Casado-Martínez** M.C., Forja J.M., DelValls T.A. "Direct comparison of amphipod sensitivities to dredged sediments from Spanish ports". *Chemosphere* 68, 677-685 (2007).
- Casanueva-Marengo** M.J., Fowley C., Hyland B.W., Hamilton G.R.C., Galindo-Riaño M.D., Callan J.F. "A new use for an old molecule: N-phenyl-2-(2-hydroxynaphthalen-1-ylmethylene)hydrazine-carbothioamide as a ratiometric 'Off-On' fluorescent probe for iron". *Tetrahedron Letters* 53, 670-673 (2012).
- Casas** J.M., Rubio R., Rauret G. "Estudio de sedimentos del río Cardener II. Contaminación por metales pesados". *Tecnología del Agua* 74, 17-24 (1990).
- Casas** J.S., Sordo J., Vidarte M.J. "Chapter 2 - Lead(II) coordination chemistry in the solid state"; en: Casas J.S., Sordo J. (Eds.) "Lead". Elsevier, 41-99 (2006).
- Castañé** P.M., Topalián M.L., Cordero R.R., Salibián A. "Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad". *Revista de Toxicología* 20, 13-18 (2003).
- Castro-González** M.I. y Méndez-Armenta, M. "Heavy metals: Implications associated to fish consumption". *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26, 263-271 (2008).
- Catálogo de playas**, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (<http://www.magrama.gob.es/es/cartografia-y-sig/>).
- Caussy** D., Gochfeld M., Gurzau E., Neagu C., Ruedel H. "Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability and risk". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 45-51 (2003).
- CDC**. "Response to Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention: Recommendations in "Low Level Lead Exposure Harms Children: A Renewed Call of Primary Prevention"". Atlanta, GA: *Centers for Disease Control and Prevention*, US. Department of Health and Human Services (2012). (http://www.cdc.gov/nceh/lead/ACCLPP/CDC_Response_Lead_Exposure_Recs.pdf).
- CE** (Comisión Europea). "Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios". DOUE, L 364/5 (2006).
- CEDEX** (Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas). "Recomendaciones para la gestión del material dragado en los puertos españoles". Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente (1994).
- Cesar** A., Choueri R.B., Riba I., Morales-Caselles C., Pereira C.D.S., Santos A.R., Abessa D.M.S., DelValls T.A. "Comparative sediment quality assessment in different littoral ecosystems from Spain (Gulf of Cadiz) and Brazil (Santos and São Vicente estuarine system)". *Environment International* 33, 429-435 (2007).

- Chakraborty** P., Babu P.V.R., Sarma V.V. "A study of lead and cadmium speciation in some estuarine and coastal sediments". *Chemical Geology* 294-295, 217-225 (2012a).
- Chakraborty** P. "Speciation of Co, Ni and Cu in the coastal and estuarine sediments: Some fundamental characteristics". *Journal of Geochemical Exploration* 115, 13-23 (2012b).
- Chakrapani** G.L. y Subramanian V. "Heavy metals distribution and fractionation in sediments of the Mahanadi River basin, India". *Environmental Geology* 22, 80-87 (1993).
- Chamjangali** M.A., Bagherian G., Mokhlesian A., Bahramian B. "Synthesis and application of chloromethylated polystyrene modified with 1-phenyl-1,2-propanedione-2-oxime thiosemi-carbazone (PPDOT) as a new sorbent for the on-line preconcentration and determination of copper in water, soil, and food samples by FAAS". *Journal of Hazardous Materials* 192, 1641-1649 (2011).
- Chanukya** B.S., Kumar M., Rastogi N.K. "Optimization of lactic acid pertraction using liquid emulsion membranes by response surface methodology". *Separation and Purification Technology* 111, 1-8 (2013).
- Chapman** P.M. "Determining when contamination is pollution - Weight of evidence determinations for sediments and effluents". *Environment International* 33, 492-501 (2007).
- Chaudhuri** A., Mitra M., Havrilla C., Waguespack Y., Schwarz J. "Heavy metal biomonitoring by seaweeds on the Delmarva Peninsula, east coast of the USA". *Botánica Marina* 50, 151-158 (2007).
- Chaudry** M.A., Bukhari N., Mazhar M. "Coupled transport of Ag(I) ions through triethanolamine-cyclohexanone-based supported liquid membranes". *Journal of Membrane Science* 320, 93-100 (2008).
- Chen** J., Gao Y., Xu Z., Wu G., Chen Y., Zhu C. "A novel fluorescent array for mercury(II) ion in aqueous solution with functionalized cadmium selenide nanoclusters". *Analytica Chimica Acta* 577, 77-84 (2006).
- Chen** Z., Owens G., Naidu R. "Confirmation of vanadium complex formation using electrospray mass spectrometry and determination of vanadium speciation by sample stacking capillary electrophoresis". *Analytica Chimica Acta* 585, 32-37 (2007).
- Chen** X.-Y., Shi J., Li Y.-M., Wang F.-L., Wu X., Guo Q.-X., Liu L. "Two-photon fluorescent probes of biological Zn(II) derived from 7-hydroxyquinoline". *Organic Letters* 11, 4426-4429 (2009).
- Chen** L., Xu Z., Liu M., Huang Y., Fan R., Su Y., Hu G., Peng X., Peng X. "Lead exposure assessment from study near a lead-acid battery factory in China". *Science of the Total Environment* 429, 191-198 (2012).
- Chen** X., Han C., Cheng H., Wang Y., Liu J., Xu Z., Hu L. "Rapid speciation analysis of mercury in seawater and marine fish by cation exchange chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry". *Journal of Chromatography A* 1314, 86-93 (2013).
- Chiffolleau** J.F., Cossa D., Auger D., Truquet I. "Trace metal distribution, partition and fluxes in the Seine estuary (France) in low discharge regime". *Marine Chemistry* 47, 145-158 (1994).

- Chiha** M., Hamdaoui O., Ahmedchekkat F., Pétrier C. "Study on ultrasonically assisted emulsification and recovery of copper(II) from wastewater using an emulsion liquid membrane process". *Ultrasonics Sonochemistry* 17, 318-325 (2010).
- Choi** Y.W., Park G.J., Na Y.J., Jo H.Y., Lee S.A., You G.R., Kim C. "A single schiff base molecule for recognizing multiple metal ions: A fluorescence sensor for Zn(II) and Al(III) and colorimetric sensor for Fe(II) and Fe(III)". *Sensors and Actuators B: Chemical* 194, 343-352 (2014).
- Choueri** R.B., Cesar A., Abessa D.M.S., Torres R.J., Morais R.D., Riba I., Pereira C.D.S, Nascimento M.R.L., Mozeto A.A., DelValls T.A. "Development of site-specific sediment quality guidelines for North and South Atlantic littoral zones: Comparison against national and international sediment quality benchmarks". *Journal of Hazardous Materials* 170, 320-331 (2009).
- Christophoridis** C., Dedepsidis D., Fytianos K. "Occurrence and distribution of selected heavy metals in the surface sediments of Thermaikos Gulf, N. Greece. Assessment using pollution indicators". *Journal of Hazardous Materials* 168, 1082-1091 (2009).
- Clark** R.B. "Marine Pollution" (Fifth Edition). Oxford University Press (2001).
- Clement** R.E. y Hao C. "2.03 - Liquid-Liquid Extraction: Basic Principles and Automation" *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, from Comprehensive Sampling and Sample Preparation* 2, 51-63 (2012).
- Clifford** M. y McGeer J.C. "Development of a biotic ligand model to predict the acute toxicity of cadmium to *Daphnia pulex*". *Aquatic Toxicology* 98, 1-7 (2010).
- Colombo** C. y Van den Berg C.M.G. "Simultaneous determination of several trace metals in seawater using cathodic stripping voltammetry with mixed ligands". *Analytica Chimica Acta* 337, 29-40 (1997).
- Comber** S.D.W., Gunn A.M., Whalley C. "Comparison of the partitioning of trace metals in the Humber and Mersey estuaries". *Marine Pollution Bulletin* 30, 851-860 (1995).
- Compañó** R., Ferrer R., Guiteras J., Dolor Prat M. "Spectrofluorimetric detection of zinc and cadmium with 8- (benzenesulfonamido)-quinoline immobilized on a polymeric matrix". *The Analyst* 119, 1225-1228 (1994).
- Conti** M.E., Tudino M.B., Muse J.O., Cecchetti F. "Biomonitoring of heavy metals and their species in the marine environment: the contribution of atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma spectrometry". *Research Trends in Applied Spectroscopy* 4, 295-324 (2002).
- Cooper** C.A., Lin Y.S., Gonzalez M. "Separation properties of surface modified silica supported liquid membranes for divalent metal removal/recovery". *Journal of Membrane Science* 229, 11-25 (2004).
- Cornelis** R. y Nordberg R. "Chapter 2 - General chemistry, sampling, analytical methods, and speciation". *Handbook on the toxicology of metals (Third Edition)*, 11-38 (2007).
- Coughanowr** C. y Whitehead J. "The Derwent Estuary Program: A collaborative model for science-based management, Tasmania, Australia". *Ocean and Coastal Management* (Article in Press) (2013).

- Couper** J.R., Penney W.R., Fair J.R., Walas S.M. "Chapter 14 - Extraction and Leaching". *Chemical Process Equipment (Third Edition)*, 487-528 (**2012**).
- Craig** P.J. "Organometallic compounds in the environment". Ed. Logman, Harlow (UK) (**1986**).
- Crichton** R.R. "Chapter 1 - An Overview of Metals and Selected Nonmetals in Biology". *Biological Inorganic Chemistry (Second Edition)*, 1-19 (**2012a**).
- Crichton** R.R. "Chapter 23 - Metals in the environment". *Biological Inorganic Chemistry (Second Edition)*, 433-445 (**2012b**).
- Crompton** T.R. "Toxicants in aqueous ecosystems. A guide for the analytical and environmental Chemist". Ed. Springer-Verlag (Alemania) (**2007**).
- Cukrowska** E., Chimuka, L., Nsengimana, H., Kwaramba, V. "Application of supported liquid membrane probe for extraction and preconcentration of organotin compounds from environmental water samples". *Analytica Chimica Acta* 523, 141-147 (**2004**).
- Cussler** E.L., Schiffer D.K., Hochhauser A., Evans D.F. "Concentrating solutes with membranes containing carriers". *Nature* 250, 484-486 (**1974**).
- Dalali** N., Yavarizadeh H., Agrawal Y.K. "Separation of zinc and cadmium from nickel and cobalt by facilitated transport through bulk liquid membrane using trioctyl methyl ammonium chloride as carrier". *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 18, 1001-1005 (**2012**).
- Dalangin** R.R. y Gunasingham H. "Mercury(II) acetate-Nafion modified electrode for anodic stripping voltammetry of lead and copper with flow-injection analysis". *Analytica Chimica Acta* 291, 81-87 (**1994**).
- Daneshvar** A., Aboulfadl K., Viglino L., Broséus R., Sauvé S., Madoux-Humery A.-S., Weyhenmeyer G.A., Prévost M. "Evaluating pharmaceuticals and caffeine as indicators of fecal contamination in drinking water sources of the Greater Montreal region". *Chemosphere* 88, 131-139 (**2012**).
- Danesi** P.R. "Separation of metal species by supported liquid membranes". *Separation Science and Technology* 19, 857-894 (**1985**).
- Das** S.K. y Chakrapani G.J. "Assessment of trace metal toxicity in soils of Raniganj Coalfield, India". *Environmental Monitoring and Assessment* 177, 63-71 (**2011**).
- Davidson** M.C., Lorna E.W., Ure A.M. "Effect of sample preparation on the operational speciation of cadmium and lead in freshwater sediment". *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 363, 134-136 (**1999**).
- Davutluoglu** O.I., Seckin G., Ersu C.B., Yilmaz T., Sari B. "Heavy metal content and distribution in surface sediments of the Seyhan River, Turkey". *Journal of Environmental Management* 92, 2250-2259 (**2011**).
- de Gyves** J. y Rodríguez E. "Metal ion separations by supported liquid membranes". *Industrial and Engineering Chemistry Research* 38, 2182-2202 (**1999**).
- de la Guardia** M. y Armenta S. "Green Analytical Chemistry: Theory and Practice". *Comprehensive Analytical Chemistry*, Volumen 57. Editorial Barceló, Elsevier (**2011**).

- de Marco** R., Clarke G., Pejic B. "Ion-selective electrode potentiometry in environmental analysis". *Electroanalysis* 19, 1987-2001 (**2007**).
- de Silva** A.P. y de Silva S.A. "Fluorescent signalling crown ethers: "switching on" of fluorescence by alkali metal ion recognition and binding in situ". *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1709-1710 (**1986**).
- de Silva** A.P. y Gunaratne H.Q.N. "Fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensors selective for submicromolar calcium with quantitatively predictable spectral and ion-binding properties". *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 2, 186-188 (**1990**).
- de Silva** A.P., Gunaratne H.Q.N., Lynch P.L.M. "Luminescence and charge transfer. Part 4. 'On-off' fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors with pyridine receptors: 1,3-Diaryl-5-pyridyl-4,5-dihydropyrazoles". *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 2, 685-690 (**1995**).
- de Silva** A.P., Gunaratne H.Q.N., Gunnlaugsson T., Huxley A.J.M., McCoy C.P., Rademacher J.T., Rice T.E. "Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches". *Chemical Reviews* 97, 1515-1566 (**1997**).
- de Silva** A.P., Moody T.S., Wright G.D. "Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools". *Analyst* 134, 2385-2393 (**2009**).
- DeForest** D.K., Brix K.V., Adams W.J. "Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure Concentration". *Aquatic Toxicology* 84, 236-246 (**2007**).
- del Valle-Gálvez** A., El Houdaigui R., Acosta-Sánchez M. "Las dimensiones internacionales del Estrecho de Gibraltar (Les dimensions internationales du Détroit de Gibraltar)". Editorial Dykinson (**2006**).
- Delgado** J., Nieto J.M., Boski T. "Analysis of the spatial variation of heavy metals in the Guadiana Estuary sediments (SW Iberian Peninsula) based on GIS-mapping techniques". *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 88, 71-83 (**2010**).
- Demirak** A., Yilmaz F., Tuna A.L., Ozdemir N. "Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in southwestern Turkey". *Chemosphere* 63, 1451-1458 (**2006**).
- Devaraj** S., Tsui Y.-K., Chiang C.-Y., Yen Y.-P. "A new dual functional sensor: Highly selective colorimetric chemosensor for Fe^{3+} and fluorescent sensor for Mg^{2+} ". *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 96, 594-599 (**2012**).
- Devlin** T.M. "Textbook of Biochemistry with clinical correlations" (Fifth Edition). Editorial John Wiley & Sons (United States of America) (**2010**).
- Díaz-de Alba** M., Galindo-Riaño M.D., Casanueva-Marengo M.J., García-Vargas M., Kosore C.M. "Assessment of the metal pollution, potential toxicity and speciation of sediment from Algeciras Bay (South of Spain) using chemometric tools". *Journal of Hazardous Materials* 190, 177-187 (**2011**).

- Díaz de Alba M.** "Avances en el control de la contaminación por metales: nuevas metodologías de análisis y especiación metálica en sistemas acuáticos. Estudios en la Bahía de Algeciras". *Tesis Doctoral*. Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica (2013).
- Díaz-Fierros Vigueira F.** "Riesgos sanitarios de la contaminación de suelos". *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 79, 388-411 (2013).
- Dilworth J.R.** y **Huetting R.** "Metal complexes of thiosemicarbazones for imaging and therapy". *Inorganica Chimica Acta* 389, 3-15 (2012).
- Ding J.,** Yuan L., Gao L., Chen J. "Fluorescence quenching of a rhodamine derivative: Selectively sensing Cu^{2+} in acidic aqueous media". *Journal of Luminescence* 132, 1987-1993 (2012).
- Divrikli U.,** Akdogan A., Soylak M., Elci L. "Solid-phase extraction of Fe(III), Pb(II) and Cr(III) in environmental samples on amberlite XAD-7 and their determinations by flame atomic absorption spectrometry". *Journal of Hazardous Materials* 149, 331-337 (2007).
- Dodani S.C.,** He Q., Chang C.J. "A turn-on fluorescent sensor for detecting nickel in living cells". *Journal of the American Chemical Society* 131, 18020-18021 (2009).
- Dodds W.K.** "Chapter 2 - Properties of water". *Freshwater Ecology*, 12-29 (2002).
- Domènech X.** y **Peral J.** "Química Ambiental de sistemas terrestres". Editorial Reverté (2006).
- Domínguez M.T.** "La restauración ecológica de zonas contaminadas por la minería: el ejemplo del corredor verde del Guadiamar". *Chronica Naturae* 2, 15-24 (2012).
- Domínguez-Lledó F.C.** "Aplicación de métodos de preconcentración/determinación de metales pesados en sedimentos y aguas: membranas líquidas-espectroscopia atómica y voltametría de redisolución". *Tesis Doctoral*. Universidad de la Habana y Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica (2006).
- Domínguez-Lledó F.C.,** Galindo-Riaño M.D., Díaz-López I.C., García-Vargas M., Granado-Castro M.D. "Applicability of a liquid membrane in enrichment and determination of nickel traces from natural waters". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 653-659 (2007).
- Dong L.,** ChongWu, Zeng X., Mu L., Xue S.-F., Tao Z., Zhang J.-X. "The synthesis of a rhodamine B schiff-base chemosensor and recognition properties for Fe^{3+} in neutral ethanol aqueous solution". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 145, 433-437 (2010).
- Dong Z.,** Tian X., Chen Y., Hou J., Guo Y., Sun J., Ma J. "A highly selective fluorescent chemosensor for Hg^{2+} based on rhodamine B and its application as a molecular logic gate". *Dyes and Pigments* 97, 324-329 (2013).
- Doong R.-a.,** Lee S.-h., Lee C.-c., Sun Y.-c., Wu S.-c. "Characterization and composition of heavy metals and persistent organic pollutants in water and estuarine sediments from Gao-ping River, Taiwan". *Marine Pollution Bulletin* 57, 846-857 (2008).
- Draa M.T.,** Belaid T., Benamor M. "Extraction of Pb(II) by XAD7 impregnated resins with organophosphorus extractants (DEHPA, IONQUEST 801, CYANEX 272)". *Separation and Purification Technology* 40, 77-86 (2004).

- Dragoe D.**, Spătaru N., Kawasaki R., Manivannan A., Spătaru T., Tryk D.A., Fujishima A. "Detection of trace levels of Pb^{2+} in tap water at boron-doped diamond electrodes with anodic stripping voltammetry". *Electrochimica Acta* 51, 2437-2441 (2006).
- Dressler V.L.**, Antes F.G., Moreira C.M., Pozebon D., Duarte F.A. "As, Hg, I, Sb, Se and Sn speciation in body fluids and biological tissues using hyphenated-ICP-MS techniques: A review". *International Journal of Mass Spectrometry* 307, 149-162 (2011).
- Du Laing G.**, Rinklebe, J., Vandecasteele, B., Meers, E., Tack, F.M.G. "Trace metal behaviour in estuarine and riverine floodplain soils and sediments: A review". *Science of the Total Environment* 407, 3972-3985 (2009).
- Duffus J.H.** "Heavy metals" - A meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 74, 793-807 (2002).
- Duinker J.C.** y Kramer C.J.M. "An experimental study on the speciation of dissolved zinc, cadmium, lead and copper in river Rhine and North sea water, by differential pulsed anodic stripping voltammetry". *Marine Chemistry* 5, 207-228 (1977).
- Duncan C.** y White A.R. "Copper complexes as therapeutic agents". *Metallomics* 4, 127-138 (2012).
- Durán I.** y Nieto O. "Electrochemical speciation of dissolved Cu, Pb and Zn in an estuarine ecosystem (Ria de Vigo, NW Spain): Comparison between data treatment methods". *Talanta* 85, 1888-1896 (2011).
- Durán I.** y Nieto O. "Water characterization in three industrialized harbours (Vigo, Bilbao and Pasajes) in North Coast of Spain". *Marine Pollution Bulletin* 64, 410-415 (2012).
- Dutta M.** y Das D. "Recent developments in fluorescent sensors for trace-level determination of toxic-metal ions". *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 32, 113-132 (2012).
- Duzgoren-Aydin N.S.** "Sources and characteristics of lead pollution in the urban environment of Guangzhou". *Science of the Total Environment* 385, 182-195 (2007).
- Eggleton J.** y Thomas K.V. "A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events". *Environment International* 30, 973-980 (2004).
- Ekino S.**, Susa M., Ninomiya T., Imamura K., Kitamura T. "Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning". *Journal of the Neurological Sciences* 262, 131-144 (2007).
- El Balkhi S.**, Trocello J.-M., Poupon J., Chappuis P., Massicot F., Girardot-Tinant N., Woimant F. "Relative exchangeable copper: A new highly sensitive and highly specific biomarker for Wilson's disease diagnosis". *Clinica Chimica Acta* 412, 2254-2260 (2011).
- El-Said N.**, El-Sheref E., Borai E. "Modeling of transport of Cs (137) by emulsion liquid membrane (18C6) in xylene promoted by ephedrine hydrochloride in stripping phase". *Journal of Membrane Science* 211, 183-191 (2003).

- El-Shazly** R.M., Al-Hazmi G.A.A., Ghazy S.E., El-Shahawi M.S., El-Asmy A.A. "Spectroscopic, thermal and electrochemical studies on some nickel(II) thiosemicarbazone complexes". *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 61, 243-252 (2005).
- Ensafi** A.A., Khayamian T., Atabati M. "Differential pulse cathodic stripping adsorption voltammetric determination of trace amounts of lead using factorial design for optimization". *Talanta* 59, 7-733 (2003).
- Ensafi** A.A., Khayamian T., Benvidi A., Mirmomtaz E. "Simultaneous determination of copper, lead and cadmium by cathodic adsorptive stripping voltammetry using artificial neural network". *Analytica Chimica Acta* 561, 225-232 (2006).
- Ensafi** A.A. y Shiraz A.Z. "On-line separation and preconcentration of lead(II) by solid-phase extraction using activated carbon loaded with xlenol orange and its determination by flame atomic absorption spectrometry". *Journal of Hazardous Materials* 150, 554-559 (2008).
- Environmental Safety Group**, Ecologistas en Acción, Agaden y Greenpeace. "Crisis ambiental y de salud en la Bahía de Algeciras/Bahía de Gibraltar" (2009). (<http://www.greenpeace.org/espana/PageFiles/181854/090619.pdf>)
- Ernst** W.G. "Overview of naturally occurring Earth materials and human health concerns". *Journal of Asian Earth Sciences* 59, 108-126 (2012).
- Ertefai** T.F., Heuer V.B., Prieto-Mollar X., Vogt C., Sylva S.P., Seewald J., Hinrichs K.-U. "The biogeochemistry of sorbed methane in marine sediments". *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 6033-6048 (2010).
- Es'haghi** Z. y Azmoodeh R. "Hollow fiber supported liquid membrane microextraction of Cu²⁺ followed by flame atomic absorption spectroscopy determination". *Arabian Journal of Chemistry* 3, 21-26 (2010).
- Escudero** L.A., Martinez L.D., Salonia J.A., Gasquez J.A. "Determination of Zn(II) in natural waters by ICP-OES with on-line preconcentration using a simple solid phase extraction system". *Microchemical Journal* 95, 164-168 (2010).
- Espada-Bellido** E., Galindo-Riaño M.D., García-Vargas M. "Sensitive adsorptive stripping voltammetric method for determination of lead in water using multivariate analysis for optimization". *Journal of Hazardous Materials* 166, 1326-1331 (2009a).
- Espada-Bellido** E., Galindo-Riaño M.D., Aouarram A., García-Vargas M. "Applicability of 2-hydroxybenzaldehyde benzoylhydrazone in the determination of trace metals by adsorptive cathodic stripping voltammetry: Relevancy of simultaneous determinations". *Analytical Sciences* 25, 903-909 (2009b).
- Estacio** F.J., García-Adiego E.M., Fa D.A., García-Gómez J.C., Daza J.L., Hortas F., Gómez-Ariza J.L. "Ecological analysis in a polluted area of Algeciras Bay (southern Spain): External 'versus' internal outfalls and environmental implications". *Marine Pollution Bulletin* 34, 780-793 (1997).
- Eustace** I.J. "Zinc, cadmium, copper and manganese in species of finfish and shellfish caught in the Derwent estuary, Tasmania". *Australian Journal of Marine & Freshwater Research* 25, 209-220 (1974).

- Eyal** A. y **Kislik** V.S. "Aqueous hybrid liquid membrane: A novel system for separation of solutes using water-soluble polymers as carriers". *Journal of Membrane Science* 161, 207-221 (**1999**).
- Fabrizzi** L. y **Poggi** A. "Sensors and switches from supramolecular chemistry". *Chemical Society Reviews* 24, 197-202 (**1995**).
- Fairbrother** A., **Wenstel** R., **Sappington** K., **Wood** W. "Framework for Metals Risk Assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68, 145-227 (**2007**).
- Fakhari** A.R., **Khorrami** A.R., **Shamsipur** M. "Selective uphill Zn^{2+} transport via a bulk liquid membrane using an azacrown ether carrier". *Separation and Purification Technology* 50, 77-81 (**2006**).
- Fan** W., **Wang** W.-X., **Chen** J., **Li** X., **Yen** Y.-F. "Cu, Ni, and Pb speciation in surface sediments from a contaminated bay of northern China". *Marine Pollution Bulletin* 44, 820-826 (**2002**).
- Fegade** U., **Marek** J., **Patil** R., **Attarde** S., **Kuwar** A. "A selective fluorescent receptor for the determination of nickel(II) in semi-aqueous media". *Journal of Luminescence* 146, 234-238 (**2014**).
- Feng** H., **Jiang** H., **Gao** W., **Weinstein** M.P., **Zhang** Q., **Zhang** W., **Yu** L., **Yuan** D., **Tao** J. "Metal contamination in sediments of the western Bohai Bay and adjacent estuaries, China". *Journal of Environmental Management* 92, 1185-1197 (**2011**).
- Ferrari** M.B., **Fava** G., **Pelizzi** C., **Tarasani** P. "Thiosemicarbazones as coordinating agents. Part 5. Zinc complexes derived from methyl pyruvate- and pyridoxal-thiosemicarbazone". *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 2153-2159 (**1992**).
- Ferraro-García** F.J., **Salgueiro-López** R., **Hidalgo-Pérez** M. "Las concentraciones industriales de Huelva y el Campo de Gibraltar y su incidencia en la economía andaluza. Informe para la Asociación de Industrias Químicas y Básicas de Huelva y la Asociación de Grandes Industrias del Campo de Gibraltar". Editado por Asociación de Industrias Químicas y Básicas de Huelva (AIQB) y Asociación Grandes Industrias del Campo de Gibraltar (AGI) (**2008**). (http://www.aiqbe.es/files/informes_otros/DIR_AUCUKE31191Y31HBUX5G/InformeAGIAIQBCompleto.pdf)
- Fifield** F.W. y **Haines** P.J. "Environmental Analytical Chemistry" (Second Edition). Ed. Blackwell Science, Oxford (UK) (**2000**).
- Finch** R.A., **Liu** M.-C., **Grill** S.P., **Rose** W.C., **Loomis** R., **Vasquez** K.M., **Cheng** Y.-C., **Sartorelli** A.C. "Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity". *Biochemical Pharmacology* 59, 983-991 (**2000**).
- Fischer** J.C., **Nganou** R., **Wartel** M. "Etude de la capacite complexante des eaux de l'estuaire et de la baie de Seine". *Talanta* 1057-1061 (**1984**).
- Fischer** E. y **Van Den Berg** C.M.G. "Anodic stripping voltammetry of lead and cadmium using a mercury film electrode and thiocyanate". *Analytica Chimica Acta* 385, 273-280 (**1999**).
- Fischer** E. y **Van Den Berg** C.M.G. "Determination of lead complexation in lake water by cathodic stripping voltammetry and ligand competition". *Analytica Chimica Acta* 432, 11-20 (**2001**).

- Fitzpatrick** D. y Glennon J.D. "Analytical Methods | Atomic Spectrometric Techniques". *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, 141-145 (2011).
- Flanagan** S.V., Johnston R.B., Zheng Y. "Arsenic in tube well water in Bangladesh: Health and economic impacts and implications for arsenic mitigation". *Bulletin of the World Health Organization* 90, 839-846 (2012).
- Florence** T.M. y Batley G.E. "Removal of trace metals from seawater by a chelating resin". *Talanta* 22, 201-204 (1975).
- Florence** T.M. "The speciation of trace elements in waters". *Talanta* 29, 345-364 (1982).
- Fontàs** C., Hidalgo M., Salvadó V., Anticó E. "Selective recovery and preconcentration of mercury with a benzoylthiourea-solid supported liquid membrane system". *Analytica Chimica Acta* 547, 255-261 (2005).
- Forcha** D., Brown K.J., Assefa Z. "Luminescence, absorption, and Stern-Volmer studies of cerium chloride and nitrate compounds in acidic and neutral aqueous, and non-aqueous solutions". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 103, 90-95 (2013).
- Förstner** U. y Wittmann G.T.W. "Metal pollution in the aquatic environment". Second revised Edition. Springer-Verlag (Alemania) (1983).
- Förstner** U., Ahlf W., Calmano W., Kersten M., Schoer J. "Assessment of metal mobility in sludges and solid wastes"; en: Broekaert J.A.C., Güger S., Adams F. (Eds.) "Metal speciation in the environment". Ed. Springer-Verlag (Alemania), 1-41 (1990).
- Förstner** U. "Metal speciation – General concepts and applications"; en: "Proceedings of the workshop on the sequential extraction of trace metals in soils and sediments". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 51, 5-23 (1993).
- Foster** P. "Concentrations and concentration factors of heavy metals in brown algae". *Environmental Pollution* 10, 45-53 (1976).
- Fouad** E.A. y Bart H.-J. "Emulsion liquid membrane extraction of zinc by a hollow-fiber contactor". *Journal of Membrane Science* 307, 156-168 (2008).
- Franco** E., López-Torres E., Mendiola M.A., Sevilla M.T. "Synthesis, spectroscopic and cyclic voltammetry studies of copper(II) complexes with open chain, cyclic and a new macrocyclic thiosemicarbazones". *Polyhedron* 19, 441-451 (2000).
- Franz** M.-C., Anderle P., Bürzle M., Suzuki Y., Freeman M.R., Hediger M.A., Kovacs G. "Zinc transporters in prostate cancer". *Molecular Aspects of Medicine* 34, 735-741 (2013).
- Fu** S.S., Mastuyama H., Teramoto M. "Ce(III) recovery by supported liquid membrane using polyethylene hollow fiber prepared via thermally induced phase separation". *Separation and Purification Technology* 36, 17-22 (2004).
- Furini** A. "Plants and Heavy metals". Ediciones Springer (Alemania) (2012).
- Gadd** G.M. "Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation". *Geoderma* 122 (2-4 SPEC. IIS.), 109-119 (2004).

- Gaikwad** A.G. y Rajput A.M. "Transport of yttrium metal ions through fibers supported liquid membrane solvent extraction". *Journal of Rare Earths* 28, 1-6 (2010).
- Galeano-Díaz** T., Guiberteau A., López-Soto M.D., Ortiz J.M. "Determination of copper with 5,5-dimethylcyclohexane-1,2,3-trione 1,2-dioxime 3-thiosemicarbazone in olive oils by adsorptive stripping square wave voltammetry". *Food Chemistry* 96, 156-162 (2006).
- Galindo** M.D., Jurado J.A., García M., González de Canales M.L., Oliva M., López F., Granado M.D., Espada E. "Trace metal accumulation in tissues of sole (*Solea senegalensis*) and the relationships with the abiotic environment". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 92, 1072-1092 (2012).
- Gameiro** M.L.F., Bento P., Ismael M.R.C., Reis M.T.A., Carvalho J.M.R. "Extraction of copper from ammoniacal medium by emulsion liquid membranes using LIX 54". *Journal of Membrane Science* 293, 151-160 (2007).
- Gameiro** M.L.F., Ismael M.R.C., Reis M.T.A., Carvalho J.M.R. "Recovery of copper from ammoniacal medium using liquid membranes with LIX 54". *Separation and Purification Technology* 63, 287-296 (2008).
- Gao** W., Habib M., Smith D.W. "Removal of organic contaminants and toxicity from industrial effluents". *Desalination* 245, 108-119 (2009).
- Gao** C., Jin X., Yan X., An P., Zhang Y., Liu L., Tian H., Liu W., Yao X., Tang Y. "A small molecular fluorescent sensor for highly selectivity of zinc ion". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 176, 775-781 (2013).
- Gao** G.-Y., Qu W.-J., Shi B.-B., Zhang P., Lin Q., Yao H., Yang W.-L., Zhang Y.-M., Wei T.-B. "A highly selective fluorescent chemosensor for iron ion based on 1H-imidazo [4,5-b] phenazine derivative". *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 121, 514-519 (2014).
- García** M.G., Acosta A.O., Marchese J. "Emulsion liquid membrane pertraction of Cr(III) from aqueous solutions using PC-88A as carrier". *Desalination* 318, 88-96 (2013).
- García-Acosta** B. "Sensores químicos cromogénicos y fluorogénicos para la detección de iones y moléculas neutras". Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Química (2007).
- Garrido** H. "Guadiamar. Ciencia, técnica y restauración: El accidente minero diez años después". Consejo superior de investigaciones científicas (CSIC) (2008).
- Gawroński** R. y Religa P. "Transport mechanism of chromium(III) through the unmixed bulk liquid membrane containing dinonylnaphthalenesulfonic acid as a carrier". *Journal of Membrane Science* 289, 187-190 (2007).
- Geddes** C.D. y Lakowicz J.R. "Advanced Concepts in Fluorescence Sensing. Part A: Small Molecule Sensing". Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. 9. Springer Science & Business Media (2005).
- Geffard** O., Geffard A., His E., Budzinski H. "Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae". *Marine Pollution Bulletin* 46, 481-490 (2003).

- Gega J.**, Walkowiak W., Gajda B. "Separation of Co(II) and Ni(II) ions by supported and hybrid liquid membranes". *Separation and Purification Technology* 22-23, 551-558 (**2001**).
- Ghaedi M.**, Ahmadi F., Soylak M. "Simultaneous preconcentration of copper, nickel, cobalt and lead ions prior to their flame atomic absorption spectrometric determination". *Annali di Chimica* 97, 277-285 (**2007**).
- Ghaedi M.**, Shokrollahi A., Kianfar A.H., Mirsadeghi A.S., Pourfarokhi A., Soylak M. "The determination of some heavy metals in food samples by flame atomic absorption spectrometry after their separation-preconcentration on bis salicyl aldehyde, 1,3 propan diimine (BSPDI) loaded on activated carbon". *Journal of Hazardous Materials* 154, 128-134 (**2008a**).
- Ghaedi M.**, Ahmadi F., Tavakoli Z., Montazerzohori M., Khanmohammadi A., Soylak M. "Three modified activated carbons by different ligands for the solid phase extraction of copper and lead". *Journal of Hazardous Materials* 152, 1248-1255 (**2008b**).
- Ghazi A.M.** y Millette J.R. "Chapter 4 – Lead". En "*Environmental Forensics. Contaminant Specific Guide*", 55-79 (**2005**).
- Gholivand M.B.** y Khorsandipoor S. "Selective and efficient uphill transport of Cu(II) through bulk liquid membrane using N-ethyl-2-aminocyclopentene-1-dithiocarboxylic acid as carrier". *Journal of Membrane Science* 180, 115-120 (**2000**).
- Gill J.S.**, Singh H., Gupta C.K. "Studies on supported liquid membrane for simultaneous separation of Fe(III), Cu(II) and Ni(II) from dilute feed". *Hydrometallurgy* 55, 113-116 (**2000**).
- Gillain G.**, Duyckaerts G., Disteche A. "Direct and simultaneous determinations of Zn, Cd, Pb, Cu, Sb and Bi dissolved in sea water by differential pulse anodic stripping voltammetry with a hanging mercury drop electrode". *Analytica Chimica Acta* 106, 23-37 (**1979**).
- Gismera M.J.**, Lacal J., da Silva P., García R., Sevilla M.T., Procopio J.R. "Study of metal fractionation in river sediments. A comparison between kinetic and sequential extraction procedures". *Environmental Pollution* 127, 175-182 (**2004**).
- Giusti L.** "Biologically available trace metals in *Mytilus edulis* from the coast of northeast England". *Environment International* 25, 969-981 (**1999**).
- Gladyshev M.I.**, Gribovskaya I.V., Moskvicheva A.V., Muchkina E.Y., Chuprov S.M., Ivanova E.A. "Content of metals in compartments of ecosystem of a Siberian pond". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41, 157-162 (**2001**).
- Goldys E.M.** "Fluorescence Applications in Biotechnology and Life Sciences" (First Edition), Wiley-Blackwell (United States of America) (**2009**).
- Gong Z.-L.**, Ge F., Zhao B.-X. "Novel pyrazoline-based selective fluorescent sensor for Zn²⁺ in aqueous media". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 159, 148-153 (**2011**).
- González D.**, Almendros P., Álvarez J.M. "Métodos de análisis de elementos en suelos: disponibilidad y fraccionamiento". *Anales de Química* 105, 205-212 (**2009**).
- González-Fernández D.**, Garrido-Pérez M.C., Casas-Ruiz M., Barbero L., Nebot-Sanz E. "Radiological risk assessment of naturally occurring radioactive materials in marine sediments

and its application in industrialized coastal areas: Bay of Algeciras, Spain". *Environmental Earth Sciences* 66, 1175-1181 (2012).

González A., Cervera M.L., Armenta S., de la Guardia M. "A review of non-chromatographic methods for speciation analysis". *Analytica Chimica Acta* 636, 129-157 (2009).

González A., Armenta S., Cervera M.L., de la Guardia M. "Non-chromatographic speciation". *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 29, 260-268 (2010).

Gorski P.R., Armstrong D.E., Hurley J.P., Krabbenhoft D.P. "Influence of natural dissolved organic carbon on the bioavailability of mercury to a freshwater alga". *Environmental Pollution* 154, 116-123 (2008).

Goswami S. y Chakrabarty R. "Highly selective colorimetric fluorescent sensor for Pb^{2+} ". *European Journal of Organic Chemistry* 20, 3791-3795 (2010).

Goyal R.K., Jayakumar N.S., Hashim M.A. "A comparative study of experimental optimization and response surface optimization of Cr removal by emulsion ionic liquid membrane". *Journal of Hazardous Materials* 195, 383-390 (2011).

Granado-Castro M.D., Galindo-Riaño M.D., García-Vargas M. "Model experiments to test the use of a liquid membrane for separation and preconcentration of copper from natural water". *Analytica Chimica Acta* 506, 81-86 (2004a).

Granado-Castro M.D., Galindo-Riaño M.D., García-Vargas M. "Separation and preconcentration of cadmium ions in natural water using a liquid membrane system with 2-acetylpyridine benzoylhydrazone as carrier by flame atomic absorption spectrometry". *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 59, 577-583 (2004b).

Granado-Castro M.D. "Metodología analítica de metales pesados en ecosistemas acuáticos. Estudio del impacto del desastre minero de Aznalcóllar en los niveles metálicos del estuario del Guadalquivir". *Tesis Doctoral*. Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica (2005).

Granado-Castro M.D., Galindo-Riaño M.D., Domínguez-Lledó F.C., Díaz-López C., García-Vargas M. "Study of the kinetics of the transport of Cu(II), Cd(II) and Ni(II) ions through a liquid membrane". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 779-788 (2008).

Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. "Methods of Seawater Analysis" (Third Edition), Verlag Chemie, Weinheim (Alemania) (1999).

Greenaway A.M. y Rankine-Jones A.I. "Elemental concentrations in coastal sediments from Hellshire, Jamaica". *Marine Pollution Bulletin* 24, 390-397 (1992).

Greenway G.M. "Chemical Speciation in the environment", (Second Edition). Chapter 4: "Hybrid methods of speciation". Ed. Blackwell Science (United States of America) (2002).

Greenwood N.N. y Earnshaw A. "Chemistry of the Elements" (Second Edition), Butterworth-Heinemann (2005).

- Gros N.**, Camões M.F., Oliveira C., Silva M.C.R. "Ionic composition of seawaters and derived saline solutions determined by ion chromatography and its relation to other water quality parameters". *Journal of Chromatography A* 1210, 92-98 (**2008**).
- Güell R.**, Anticó E., Salvadó V., Fontàs C. "Efficient hollow fiber supported liquid membrane system for the removal and preconcentration of Cr(VI) at trace levels". *Separation and Purification Technology* 62, 389-393 (**2008**).
- Guerra-García J.M.**, Maestre M.J., González A.R., García-Gómez J.C. "Assessing a quick monitoring method using rocky intertidal communities as a bioindicator: A multivariate approach in Algeciras Bay". *Environmental Monitoring and Assessment* 116, 345-361 (**2006**).
- Guerra-García J.M.**, Baeza-Rojano E., Cabezas M.P., Díaz-Pavón J.J., Pacios I., García-Gómez J.C. "The amphipods *Caprella penantis* and *Hyale schmidtii* as biomonitors of trace metal contamination in intertidal ecosystems of Algeciras Bay, Southern Spain". *Marine Pollution Bulletin* 58, 783-786 (**2009**).
- Guerra-García J.M.**, Ruiz-Tabares A., Baeza-Rojano E., Cabezas M.P., Díaz-Pavón J.J., Pacios I., Maestre M., González A.R., Espinosa F., García-Gómez J.C., García-Gómez J.C. "Trace metals in *Caprella* (Crustacea: Amphipoda). A new tool for monitoring pollution in coastal areas?". *Ecological Indicators* 10, 734-743 (**2010**).
- Guevara-Riba A.**, Sahuquillo A., Rubio R., Rauret G. "Assessment of metal mobility in dredged harbour sediments from Barcelona, Spain". *Science of The Total Environment* 321, 241-255 (**2004**).
- Guillén M.T.**, Delgado J., Albanese S., Nieto J.M., Lima A., De Vivo B. "Heavy metals fractionation and multivariate statistical techniques to evaluate the environmental risk in soils of Huelva Township (SW Iberian Peninsula)". *Journal of Geochemical Exploration* 119-120, 32-43 (**2012**).
- Gumí T.**, Oleinikova M., Palet C., Valiente M. y Muñoz M. "Facilitated transport of lead(II) and cadmium(II) through novel activated composite membranes containing di-(2-ethyl-hexyl)phosphoric acid as carrier". *Analytica Chimica Acta* 408, 65-74 (**2000**).
- Gunasingham H.** y Dalangin R.R. "Anodic stripping voltammetry of lead using a copper-mercury film electrode". *Analytica Chimica Acta* 246, 309-313 (**1991**).
- Guo W.**, Liu X., Liu Z., Li G. "Pollution and potential ecological risk evaluation of heavy metals in the sediments around Dongjiang Harbor, Tianjin". *Procedia Environmental Sciences* 2, 729-736 (**2010**).
- Gupta V.K.**, Imran A., Aboul-Enein, H.Y. "Metal ions speciation in the environment: Distribution, toxicities and analyses"; en: Sarkar D., Datta R., Hannigan R. (Eds.) "Developments in Environmental Science", Volumen 5, Geological Society of America, 33-57 (**2007**).
- Gupta V.K.** y Ali I. "Chapter 1 - Introduction". *Environmental Water. Advances in treatment, remediation and recycling*, 1-27 (**2013**).
- Gurnani V.** y Singh A.K. "Equilibrium studies on the optimization of solid-phase extraction of metal ions with pyrogallol-anchored cellulose synthesized by a new method and applications of the extraction in metal enrichment, removal, and determination". *Industrial and Engineering Chemistry Research* 43, 2302-2309 (**2004**).

- Guyon F.**, Parthasarathy N., Buffle J. "Mechanism and kinetics of copper(II) transport through diaza-crown ether-fatty acid-supported liquid membrane". *Analytical Chemistry* 71, 819-826 (1999).
- Gwaltney-Brant S.M.** "Chapter 41 - Heavy metals". *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition), Volume II*, 1315-1347 (2013).
- Haase H.**, Overbeck S., Rink L. "Zinc supplementation for the treatment or prevention of disease: Current status and future perspectives". *Experimental Gerontology* 43, 394-408 (2008).
- Hänsch R.** y Mendel R.R. "Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl)". *Current Opinion in Plant Biology* 12, 259-266 (2009).
- Hashimoto Y.**, Yamaguchi N., Takaoka M., Shiota K. "EXAFS speciation and phytoavailability of Pb in a contaminated soil amended with compost and gypsum". *Science of the Total Environment* 409, 1001-1007 (2011).
- Hasle J.R.** y Abdullah M.I. "Analytical fractionation of dissolved copper, lead and cadmium in coastal Seawater". *Marine Chemistry* 10, 487-503 (1981).
- Hatje V.**, Apte S.C., Hales L.T., Birch G.F. "Dissolved trace metal distributions in Port Jackson estuary (Sydney Harbour), Australia". *Marine Pollution Bulletin* 46, 719-730 (2003).
- Haus N.**, Zimmermann S., Wiegand J., Sures B. "Occurrence of platinum and additional traffic related heavy metals in sediments and biota". *Chemosphere* 66, 619-629 (2007).
- Heimbürger L.-E.**, Cossa D., Thibodeau B., Khripounoff A., Mas V., Chiffoleau J.-F., Schmidt S., Migon C. "Natural and anthropogenic trace metals in sediments of the Ligurian Sea (Northwestern Mediterranean)". *Chemical Geology* 291, 141-151 (2012).
- Henshaw P.C.**, Charlson R.J., Burges S.J. "Chapter 6 – Water and the hydrosphere". *International Geophysics* 72 (C), 109-131 (2000).
- Hentze M.W.**, Muckenthaler M.U., Galy B., Camaschella C. "Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism". *Cell* 142, 24-38 (2010).
- Hermosin M.C.**, Calderon M.J., Real M., Cornejo J. "Impact of herbicides used in olive groves on waters of the Guadalquivir river basin (southern Spain)". *Agriculture, Ecosystems and Environment* 164, 229-243 (2013).
- Hilal Gubbuk I.**, Gungor O., Korkmaz Alpoguz H., Ersoz M., Yilmaz M. "Kinetic study of mercury(II) transport through a liquid membrane containing calix[4]arene nitrile derivatives as a carrier in chloroform". *Desalination* 261, 157-161 (2010).
- Hill S.** "Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications" (Second Edition). Ed. Blackwell Publishing Oxford (UK) (2007).
- Hirose K.** "Chemical speciation of trace metals in seawater: a review". *Analytical Sciences* 22, 1055-1063 (2006).
- Hlavay J.**, Prohaska T., Weisz M., Wenzel W.W., Stingeder G.J. "Determination of trace elements bound to soils and sediment fractions (IUPAC technical report)". *Pure and Applied Chemistry* 76, 415-442 (2004).

Horiguchi H., Oguma E., Sasaki S., Okubo H., Murakami K., Miyamoto K., Hosoi Y., Murata K., Kayama, F. "Age-relevant renal effects of cadmium exposure through consumption of home-harvested rice in female Japanese farmers". *Environment International* 56, 1-9 (2013).

Horowitz A.J. "A primer on trace metal-sediment chemistry". Ed. U.S. Geological Survey (United States of America) (1986).

Horváth M., Halász G., Kucanová E., Kuciková B., Fekete I., Remeteiová D., Heltai G., Flórián K. "Sequential extraction studies on aquatic sediment and biofilm samples for the assessment of heavy metal mobility". *Microchemical Journal* 107, 121-125 (2013).

Hoshi S., Fujisawa H., Nakamura K., Nakata S., Uto M., Akatsuka K. "Preparation of Amberlite XAD resins coated with dithiosemicarbazone compounds and preconcentration of some metal ions". *Talanta* 41, 503-507 (1994).

Hosten E. y Welz B. "Evaluation of an immobilised macrocyclic material for on-line column preconcentration and separation of cadmium, copper and lead for electrothermal atomic absorption spectrometry". *Analytica Chimica Acta* 392, 55-65 (1999).

Hou D., He J., Lü C., Ren L., Fan Q., Wang J., Xie Z. "Distribution characteristics and potential ecological risk assessment of heavy metals (Cu, Pb, Zn, Cd) in water and sediments from Lake Dalinouer, China". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 93, 135-144 (2013).

House J.E. "Chapter 23 - Bioinorganic Chemistry". *Inorganic Chemistry (Second Edition)*, 773-795 (2013).

<http://www.epa.gov/safewater/contaminants/index.html>

<http://www.chemspider.com/>

http://www.portofalgeciras.com/handbook_2013/

<http://www.sigmaaldrich.com/>

<http://www.stenutz.eu/> (Home page of R. Stenutz, Stockholm University)

Hu Z.-Q., Lin C.-S., Wang X.-M., Ding L., Cui C.-L., Liu S.-F., Lu H.Y. "Highly sensitive and selective turn-on fluorescent chemosensor for Pb²⁺ and Hg²⁺ based on a rhodamine-phenylurea conjugate". *Chemical Communications* 46, 3765-3767 (2010).

Hu B., Cui R., Li J., Wei H., Zhao J., Bai F., Song W., Ding X. "Occurrence and distribution of heavy metals in surface sediments of the Changhua River Estuary and adjacent shelf (Hainan Island)". *Marine Pollution Bulletin* 76, 400-405 (2013a).

Hu S., Zhang S., Hu Y., Tao Q., Wu A. "A new selective pyrazoline-based fluorescent chemosensor for Cu²⁺ in aqueous solution". *Dyes and Pigments* 96, 509-515 (2013b).

Hu S., Wu G., Xu C., Dong J., Gao Q. "A new fluorescent chemosensor for Fe³⁺ based upon 2,5-diphenylfuran and 8-hydroxyquinoline". *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 270, 37-42 (2013c).

- Huang** Z.-Y., Chen F.-R., Zhuang Z.-X., Wang X.-R., Lee F.S.C. "Trace lead measurement and on-line removal of matrix interference in seawater by isotope dilution coupled with flow injection and ICP-MS". *Analytica Chimica Acta* 508, 239-245 (2004).
- Huang** F., Glessner J., Ianno A., Lundstrom C., Zhang Z. "Magnesium isotopic composition of igneous rock standards measured by MC-ICP-MS". *Chemical Geology* 268, 15-23 (2009).
- Huang** X., Dong Y., Meng J., Cheng Y., Zhu C. "Fluorescence polymer incorporating triazole and Benzo[2,1,3]thiadiazole moieties for Ni^{2+} detection". *Synlett* 12, 1841-1844 (2010).
- Huang** S., He S., Lu Y., Wei F., Zeng X., Zhao L. "Highly sensitive and selective fluorescent chemosensor for Ag^+ based on a coumarin-Se2N chelating conjugate". *Chemical Communications* 47, 2408-2410 (2011).
- Huang** J., Ge X., Wang D. "Distribution of heavy metals in the water column, suspended particulate matters and the sediment under hydrodynamic conditions using an annular flume". *Journal of Environmental Sciences (China)* 24, 2051-2059 (2012a).
- Huang** P.-C., Su P.-H., Chen H.-Y., Huang H.-B., Tsai J.-L., Huang H.-I., Wang S.-L. "Childhood blood lead levels and intellectual development after ban of leaded gasoline in Taiwan: A 9-year prospective study". *Environment International* 40, 88-96 (2012b).
- Huber** C., Filella M., Town R.M. "Computer modelling of trace metal ion speciation: Practical implementation of a linear continuous function for complexation by natural organic matter". *Computers and Geosciences* 28, 587-596 (2002).
- Inês** M., Almeida G.S., Cattrall R.W., Kolev S.D. "Recent trends in extraction and transport of metal ions using polymer inclusion membranes (PIMs)". *Journal of Membrane Science* 415-416, 9-23 (2012).
- Iordache** V., Ion S., Pohoată A. "Integrated modeling of metals biogeochemistry: Potential and limits". *Chemie der Erde - Geochemistry* 69 (SUPPL.), 125-169 (2009).
- Irigoyen** L., Moreno C., Mendiguchía C., García-Vargas, M. "Application of liquid membranes to sample preconcentration for the spectrometric determination of cadmium in seawater". *Journal of Membrane Science* 274, 169-172 (2006).
- Islam** A., Laskar M.A., Ahmad A. "Characterization of a novel chelating resin of enhanced hydrophilicity and its analytical utility for preconcentration of trace metal ions". *Talanta* 81, 1772-1780 (2010).
- ISO**, Soil Quality. "Extraction of trace metals soluble in aqua regia". Ed. International Organization of Standardization, vol. ISO-11466 (1994).
- Issa** R.M., Khedr A.M., Rizk H. "H NMR, IR and UV/VIS spectroscopic studies of some Schiff bases derived from 2-aminobenzothiazole and 2-amino-3-hydroxypyridine". *Journal of the Chinese Chemical Society* 55, 875-884 (2008).
- Isshiki** K., Tsuji F., Kuwamoto T., Nakayama E. "Preconcentration of trace metals from seawater with 7-dodecenyl-8-quinolinol impregnated macroporous resin". *Analytical Chemistry* 59, 2491-2495 (1987).

- Isshiki** K., Sohrin Y., Karartini H., Nakayama K. "Preconcentration of chromium(III) and chromium(VI) in seawater by complexation with quinolin-8-ol and adsorption on macroporous resin". *Analytica Chimica Acta* 224, 55-64 (**1989**).
- IUPAC**. McNaught A.D., Wilkinson A. "Compendium of Chemical Terminology" (Second Edition) (the "Gold Book"). Blackwell Scientific Publications, Oxford (UK) (**1997**).
- Iyoshi** S., Taki M., Yamamoto Y. "Rosamine-based fluorescent chemosensor for selective detection of silver(I) in an aqueous solution". *Inorganic Chemistry* 47, 3946-3948 (**2008**).
- Jafari** S., Yaftian M.R., Parinejad M. "Facilitated transport of cadmium as anionic iodo-complexes through bulk liquid membrane containing hexadecyltrimethylammonium bromide". *Separation and Purification Technology* 70, 118-122 (**2009**).
- Jain** V.K., Sait S.S., Shrivastav P., Agrawal Y.K. "Application of chelate forming resin Amberlite XAD-2-o-vanillinthiosemicarbazone to the separation and preconcentration of copper(II), zinc(II) and lead(II)". *Talanta* 45, 397-404 (**1997**).
- Jang** Y.K., Nam U.C., Kwon H.L., Hwang I.H., Kim C. "A selective colorimetric and fluorescent chemosensor based-on naphthol for detection of Al^{3+} and Cu^{2+} ". *Dyes and Pigments* 99, 6-13 (**2013**).
- Jaquenod de Zsögön** S. "Derecho Ambiental. La gobernanza de las aguas". Primera edición, primera reimpresión. Editorial Dykinson (Madrid) (**2005**).
- Jayabharathi** J., Thanikachalam V., Jayamoorthy K., Sathishkumar R. "Selective quenching of benzimidazole derivatives by Cu^{2+} metal ion". *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 97, 384-387 (**2012**).
- Jiang** X.-J., Fu Y., Tang H., Zang S.-Q., Hou H.-W., Mak T.C.W., Zhang H.-Y. "A new highly selective fluorescent sensor for detection of Cd^{2+} and Hg^{2+} based on two different approaches in aqueous solution". *Sensors and Actuators B: Chemical* 190, 844-850 (**2014**).
- Jiménez-Jiménez** M.B. "Receptores fluorogénicos como sensores para dicarboxilatos". Universidad de Salamanca. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Orgánica (**2010**).
- Job** P. "Formation and stability of inorganic complexes in solution". *Annales de Chimie* 9, 113-203 (**1928**).
- Jouanneau** J.M., Latouche C., Pautrizel F. "Critical analysis of sequential extractions by the study of several constituents of extraction residues". *Environmental Technology Letters* 4, 509-514 (**1983**).
- Ju** Y.-R., Chen W.-Y., Liao C.-M. "Assessing human exposure risk to cadmium through inhalation and seafood consumption". *Journal of Hazardous Materials* 227-228, 353-361 (**2012**).
- Jung** J.Y., Han S.J., Chun J., Lee C., Yoon J. "New thiazolothiazole derivatives as fluorescent chemosensors for Cr^{+3} and Al^{+3} ". *Dyes and Pigments* 94, 423-426 (**2012**).
- Junta de Andalucía**. "Catálogo de especies de peces de interés comercial de la costa sur atlántica de la Península Ibérica" (**2007**).

- Jurado-González** J.A. "Metodología analítica para el análisis de cadmio en agua de mar por AdCSV. Distribución y comportamiento biogeoquímico de metales en ecosistemas marinos costeros singulares del Golfo de Cádiz: Ría de Huelva y Bahía de Cádiz". *Tesis Doctoral*. Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica (2003).
- Jurchen** K.M.C. y Raymond, K.N. "A bidentate terephthalamide ligand, TAMmeg, as an entry into terephthalamide-containing therapeutic iron chelating agents". *Inorganic Chemistry* 45, 2438-2447 (2006).
- Kakhki** R.M.Z. y Rounaghi, G. "Selective uranyl cation detection by polymeric ion selective electrode based on benzo-15-crown-5". *Materials Science and Engineering C* 31, 1637-1642 (2011).
- Kalina** M., Klučáková M., Sedláček P. "Utilization of fractional extraction for characterization of the interactions between humic acids and metals". *Geoderma* 207-208, 92-98 (2013).
- Kamila** S., Callan J.F., Mulrooney R.C., Middleton M. "A novel fluorescent chemosensor for Cu(II) in aqueous solution based on a β -aminobisphosphonate receptor". *Tetrahedron Letters* 48, 7756-7760 (2007).
- Kandaz** M., Güney O., Senkal F.B. "Fluorescent chemosensor for Ag(I) based on amplified fluorescence quenching of a new phthalocyanine bearing derivative of benzofuran". *Polyhedron* 28, 3110-3114 (2009).
- Kandwal** P., Ansari S.A., Mohapatra P.K. "Transport of cesium using hollow fiber supported liquid membrane containing calix[4]arene-bis(2,3-naphtho)crown-6 as the carrier extractant: Part II. Recovery from simulated high level waste and mass transfer modeling". *Journal of Membrane Science* 384, 37-43 (2011).
- Kandwal** P., Ansari S.A., Mohapatra P.K. "A highly efficient supported liquid membrane system for near quantitative recovery of radio-strontium from acidic feeds. Part II: Scale up and mass transfer modeling in hollow fiber configuration". *Journal of Membrane Science* 405-406, 85-91 (2012).
- Kappen** P., Welter E., Beck P.H., McNamara J.M., Moroney K.A., Roe G.M., Read A., Pigram P.J. "Time-resolved XANES speciation studies of chromium on soils during simulated contamination". *Talanta* 75, 1284-1292 (2008).
- Karadede** H. y Ünlü E. "Concentrations of some heavy metals in water, sediment and fish species from the Atatürk Dam Lake (Euphrates), Turkey". *Chemosphere* 41, 1371-1376 (2000).
- Karak** D., Banerjee A., Sahana A., Guha S., Lohar S., Adhikari S.S., Das D. "9-Acridone-4-carboxylic acid as an efficient Cr(III) fluorescent sensor: Trace level detection, estimation and speciation studies". *Journal of Hazardous Materials* 188, 274-280 (2011).
- Karbassi** A.R., Nouri J., Nabi Bidhendi Gh.R., Ayaz G.O. "Behavior of Cu, Zn, Pb, Ni and Mn during mixing of freshwater with the Caspian Sea water". *Desalination* 229, 118-124 (2008).
- Karve** M. y Rajgor R.V. "Solid phase extraction of lead on octadecyl bonded silica membrane disk modified with Cyanex302 and determination by flame atomic absorption spectrometry". *Journal of Hazardous Materials* 141, 607-613 (2007).

- Katsou** E., Malamis S., Tzanoudaki M., Haralambous K.J., Loizidou M. "Regeneration of natural zeolite polluted by lead and zinc in wastewater treatment systems". *Journal of Hazardous Materials* 189, 773-786 (**2011**).
- Kaur** V., Aulakh J.S., Malik A.K. "A new approach for simultaneous determination of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Pd(II) using 2-thiophenalddehyde-3-thiosemicarbazone as reagent by solid phase microextraction-high performance liquid chromatography". *Analytica Chimica Acta* 603, 44-50 (**2007**).
- Kedari** C.S., Pandit S.S., Gandhi P.M. "Separation by competitive transport of uranium(VI) and thorium(IV) nitrates across supported renewable liquid membrane containing trioctylphosphine oxide as metal carrier". *Journal of Membrane Science* 430, 188-195 (**2013**).
- Kennish** M.J. "Practical handbook of estuarine and marine pollution". Ed. CRC Press, New York (**1996**).
- Kentish** S.E. y Stevens G.W. "Innovations in separations technology for the recycling and re-use of liquid waste streams". *Chemical Engineering Journal* 84, 149-159 (**2001**).
- Kim** Y.-S., In G., Han C.-W., Choi J.-M. "Studies on synthesis and application of XAD-4-salen chelate resin for separation and determination of trace elements by solid phase extraction". *Microchemical Journal* 80, 151-157 (**2005**).
- Kim** H.J., Park J.E., Choi M.G., Ahn S., Chang S.-K. "Selective chromogenic and fluorogenic signalling of Hg²⁺ ions using a fluorescein-coumarin conjugate". *Dyes and Pigments* 84, 54-58 (**2010**).
- Kim** S.A., Kamala-Kannan S., Lee K.-J., Park Y.-J., Shea P.J., Lee W.-H., Kim H.-M., Oh B.-T. "Removal of Pb(II) from aqueous solution by a zeolite-nanoscale zero-valent iron composite". *Chemical Engineering Journal* 217, 54-60 (**2013a**).
- Kim** H., Kim K.B., Song E.J., Hwang I.H., Noh J.Y., Kim P.-G., Jeong K.-D., Kim C. "Turn-on selective fluorescent probe for trivalent cations". *Inorganic Chemistry Communications* 36, 72-76 (**2013b**).
- Kim** H., Kang J., Kim K.B., Song E.J., Kim C. "A highly selective quinoline-based fluorescent sensor for Zn(II)". *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 118, 883-887 (**2014**).
- Kirkbright** G.F., West T.S., Woodward C. "Spectrofluorometric determination of submicrogram amounts of aluminum and beryllium with 2-hydroxy-3-naphthoic acid". *Analytical Chemistry* 37, 137-143 (**1965**).
- Kirowa-Eisner** E., Brand M., Tzur D. "Determination of sub-nanomolar concentrations of lead by anodic-stripping voltammetry at the silver electrode". *Analytica Chimica Acta* 385, 325-335 (**1999**).
- Kislik** V.S. y Eyal A.M. "Hybrid liquid membrane (HLM) and supported liquid membrane (SLM) based transport of titanium(IV)". *Journal of Membrane Science* 111, 273-281 (**1996**).
- Kislik** V.S. y Eyal A.M. "Aqueous hybrid liquid membrane process for metal separation. Part I. A model for transport kinetics and its experimental verification". *Journal of Membrane Science* 169, 119-132 (**2000a**).

- Kislik** V.S. y Eyal A.M. "Aqueous hybrid liquid membrane process for metal separation. Part II. Selectivity of metals separation from wet-process phosphoric acid". *Journal of Membrane Science* 169, 133-146 (**2000b**).
- Kislik** V.S. "Liquid Membranes. Principles and Applications in Chemical Separations and Wastewater Treatment" (First Edition), Elsevier (**2010**).
- Kislik** V.S. "Solvent Extraction" (First Edition), Elsevier (**2012**).
- Kitaev** Y.P., Buzykin B.L., Troepol'skaya T.V. "The Structure of Hydrazones". *Russian Chemical Review* 39, 441-456 (**1970**).
- Kocherginsky** N.M. y Yang, Q. "Big Carrousel mechanism of copper removal from ammoniacal wastewater through supported liquid membrane". *Separation and Purification Technology* 54, 104-116 (**2007**).
- Kocjan** R. "Retention of some metal ions and their separation on silica gel modified with acid red 88". *Mikrochimica Acta* 131, 153-158 (**1999**).
- Koduru** J.R. y Lee K.D. "Evaluation of thiosemicarbazone derivative as chelating agent for the simultaneous removal and trace determination of Cd(II) and Pb(II) in food and water samples". *Food Chemistry* 150, 1-8 (**2014**).
- Kokkinos** C., Economou A., Raptis I., Efstathiou C.E. "Lithographically fabricated disposable bismuth-film electrodes for the trace determination of Pb(II) and Cd(II) by anodic stripping voltammetry". *Electrochimica Acta* 53, 5294-5299 (**2008**).
- Koneswaran** M. y Narayanaswamy R. "L-Cysteine-capped ZnS quantum dots based fluorescence sensor for Cu^{2+} ion". *Sensors and Actuators B: Chemical* 139, 104-109 (**2009**).
- Kontrec** J., Kralj D., Brečević L. "Cadmium removal from calcium sulphate suspension by liquid membrane extraction during recrystallization of calcium sulphate anhydrite". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 223, 239-249 (**2003**).
- Korfali** S.I. y Davies B.E. "Speciation of metals in sediment and water in a river underlain by limestone: role of carbonate species for purification capacity of rivers". *Advances in Environmental Research* 8, 599-612 (**2004**).
- Korn** M.D.G.A., De Andrade J.B., De Jesus D.S., Lemos V.A., Bandeira M.L.S.F., Dos Santos W.N.L., Bezerra M.A., Amorim F.A.C., Souza A.S., Ferreira S.L.C. "Separation and preconcentration procedures for the determination of lead using spectrometric techniques: A review". *Talanta* 69, 16-24 (**2006**).
- Koshikawa** M.K., Takamatsu T., Takada J., Zhu M., Xu B., Chen Z., Murakami S., Xu K., Watanabe M. "Distributions of dissolved and particulate elements in the Yangtze estuary in 1997-2002: Background data before the closure of the Three Gorges Dam". *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 71, 26-36 (**2007**).
- Koter** S., Szczepański P., Mateescu M., Nechifor G., Badalau L., Koter I. "Modeling of the cadmium transport through a bulk liquid membrane". *Separation and Purification Technology* 107, 135-1432 (**2013**).

- Koukouzias** N., Vasilatos C., Itskos G., Mitsis I., Moutsatsou A. "Removal of heavy metals from wastewater using CFB-coal fly ash zeolitic materials". *Journal of Hazardous Materials* 173, 581-588 (2010).
- Kozłowski** C.A. "Facilitated transport of metal ions through composite and polymer inclusion membranes". *Desalination* 198, 132-140 (2006).
- Kumar** M., Rathore D.P.S., Singh A.K. "Amberlite XAD-2 functionalized with o-aminophenol: Synthesis and applications as extractant for copper(II), cobalt(II), cadmium(II), nickel(II), zinc(II) and lead(II)". *Talanta* 51, 1187-1196 (2000a).
- Kumar** M., Rathore D.P.S., Singh A.K. "Metal ion enrichment with Amberlite XAD-2 functionalized with Tiron: Analytical applications". *Analyst* 125, 1221-1226 (2000b).
- Kumbasar** R.A. y Tutkun O. "Separation and concentration of gallium from acidic leach solutions containing various metal ions by emulsion type of liquid membranes using TOPO as mobile carrier". *Hydrometallurgy* 75, 111-121 (2004).
- Kumbasar** R.A. y Şahin I. "Separation and concentration of cobalt from ammoniacal solutions containing cobalt and nickel by emulsion liquid membranes using 5,7-dibromo-8-hydroxyquinoline (DBHQ)". *Journal of Membrane Science* 325, 712-718 (2008a).
- Kumbasar** R.A. "Studies on extraction of chromium(VI) from acidic solutions containing various metal ions by emulsion liquid membrane using Alamine 336 as extractant". *Journal of Membrane Science* 325, 460-466 (2008b).
- Kumbasar** R.A. "Transport of cadmium ions from zinc plant leach solutions through emulsion liquid membrane-containing Aliquat 336 as carrier". *Separation and Purification Technology* 63, 592-599 (2008c).
- Kumbasar** R.A. "Selective extraction of nickel from ammoniacal solutions containing nickel and cobalt by emulsion liquid membrane using 5,7-dibromo-8-hydroxyquinoline (DBHQ) as extractant". *Minerals Engineering* 22, 530-536 (2009a).
- Kumbasar** R.A. y Kasap S. "Selective separation of nickel from cobalt in ammoniacal solutions by emulsion type liquid membranes using 8-hydroxyquinoline (8-HQ) as mobile carrier". *Hydrometallurgy* 95, 121-126 (2009b).
- Kumbasar** R.A. "Cobalt-nickel separation from acidic thiocyanate leach solutions by emulsion liquid membranes (ELMs) using TOPO as carrier". *Separation and Purification Technology* 68, 208-215 (2009c).
- Kumbasar** R.A. "Separation and concentration of cobalt from zinc plant acidic thiocyanate leach solutions containing cobalt and nickel by an emulsion liquid membrane using triisooctylamine as carrier". *Journal of Membrane Science* 333, 118-124 (2009d).
- Kumbasar** R.A. "Extraction and concentration study of cadmium from zinc plant leach solutions by emulsion liquid membrane using trioctylamine as extractant". *Hydrometallurgy* 95, 290-296 (2009e).

- Kumbasar** R.A. "Extraction of chromium(VI) from multicomponent acidic solutions by emulsion liquid membranes using TOPO as extractant". *Journal of Hazardous Materials* 167, 1141-1147 (2009f).
- Kumbasar** R.A. "Selective extraction and concentration of chromium(VI) from acidic solutions containing various metal ions through emulsion liquid membranes using Amberlite LA-2". *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 16, 829-836 (2010a).
- Kumbasar** R.A. "Selective extraction of chromium(VI) from multicomponent acidic solutions by emulsion liquid membranes using tributylphosphate as carrier". *Journal of Hazardous Materials* 178, 875-882 (2010b).
- Kumbasar** R.A. "Selective transport of cobalt(II) from ammoniacal solutions containing cobalt(II) and nickel(II) by emulsion liquid membranes using 8-hydroxyquinoline". *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 18, 145-151 (2012).
- Kyle** J.H., Breuer P.L., Bunney K.G., Pleysier R., May P.M. "Review of trace toxic elements (Pb, Cd, Hg, As, Sb, Bi, Se, Te) and their deportment in gold processing. Part 1: Mineralogy, aqueous chemistry and toxicity". *Hydrometallurgy* 107, 91-100 (2011).
- Lakowicz** J.R. "Topics in Fluorescence Spectroscopy. Volume 4: Probe design and chemical sensing". Plenum Press (1994).
- Lakowicz** J.R. "Principles of Fluorescence Spectroscopy" (Third Edition), Ed. Springer (Alemania) (2006).
- Lanceleur** L., Schäfer J., Chiffolleau J.-F., Blanc G., Auger D., Renault S., Baudrimont M., Audry S. "Long-term records of cadmium and silver contamination in sediments and oysters from the Gironde fluvial-estuarine continuum - Evidence of changing silver sources". *Chemosphere* 85, 1299-1305 (2011).
- Lazarova** Z. y Boyadzhiev L. "Kinetic aspects of copper(II) transport across liquid membrane containing LIX-860 as a carrier". *Journal of Membrane Science* 78, 239-245 (1993).
- Lee** J.-D. y Lo J.-M. "Preconcentration of trace metals in sea water matrix for differential pulse anodic stripping voltammetry". *Analytica Chimica Acta* 287, 259-266 (1994).
- Lee** J., Lee H.K., Rasmussen K.E., Pedersen-Bjergaard S. "Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review". *Analytica Chimica Acta* 624, 253-268 (2008).
- Lee** H.Y., Swamy K.M.K., Jung J.Y., Kim G., Yoon J. "Rhodamine hydrazone derivatives based selective fluorescent and colorimetric chemodosimeters for Hg^{2+} and selective colorimetric chemosensor for Cu^{2+} ". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 182, 530-537 (2013).
- Leleyter** L., Rousseau C., Biree L., Baraud F. "Comparison of EDTA, HCl and sequential extraction procedures, for selected metals (Cu, Mn, Pb, Zn), in soils, riverine and marine sediments". *Journal of Geochemical Exploration* 116-117, 51-59 (2012).
- Lenoble** V., Omanović D., Garnier C., Mounier S., Donlagić N., Le Poupon C., Pižeta I. "Distribution and chemical speciation of arsenic and heavy metals in highly contaminated waters used for

health care purposes (Srebrenica, Bosnia and Herzegovina)". *Science of the Total Environment* 443, 420-428 (2013).

León G. y Guzmán M.A. "Facilitated transport of cobalt through bulk liquid membranes containing diethylhexyl phosphoric acid". *Desalination* 162, 211-215 (2004).

León G. y Guzmán M.A. "Kinetic study of the effect of carrier and stripping agent concentrations on the facilitated transport of cobalt through bulk liquid membranes". *Desalination* 184, 79-87 (2005).

León G., Guzmán M.A. "Facilitated transport of copper through bulk liquid membranes containing different carriers: compared kinetic study". *Desalination* 223, 330-336 (2008).

Li F., Wang D.-D., Yan X.-P., Su R.-G., Lin J.-M. "Speciation analysis of inorganic arsenic by microchip capillary electrophoresis coupled with hydride generation atomic fluorescence spectrometry". *Journal of Chromatography A* 1081, 232-237 (2005).

Li C.-Y., Zhang X.-B., Jin Z., Han R., Shen G.-L., Yu R.-Q. "A fluorescent chemosensor for cobalt ions based on a multi-substituted phenol-ruthenium(II) tris(bipyridine) complex". *Analytica Chimica Acta* 580, 143-148 (2006).

Li Z., Xiang Y., Tong A. "Ratiometric chemosensor for fluorescent determination of Zn^{2+} in aqueous ethanol". *Analytica Chimica Acta* 619, 75-80 (2008).

Li Z., Chang X., Hu Z., Huang X., Zou X., Wu Q., Nie R. "Zincon-modified activated carbon for solid-phase extraction and preconcentration of trace lead and chromium from environmental samples". *Journal of Hazardous Materials* 166, 133-137 (2009).

Li L., Dang Y.-Q., Li H.-W., Wang B., Wu Y. "Fluorescent chemosensor based on Schiff base for selective detection of zinc(II) in aqueous solution". *Tetrahedron Letters* 51, 618-621 (2010).

Li S.-X. y Zheng F.-Y. "Effect of macronutrient enrichment on the size distribution, sorption, and bioconcentration factor of iron by coastal phytoplanktonic diatoms". *Marine Environmental Research* 72, 89-95 (2011a).

Li Z., Xi P., Huang L., Xie G., Shi Y., Liu H., Xu M., Chen F., Zeng Z. "A highly selective fluorescent chemosensor for Cd(II) based on 8-hydroxyquinoline platform". *Inorganic Chemistry Communications* 14, 1241-1244 (2011b).

Li Z., Zhao W., Zhang Y., Zhang L., Yu M., Liu J., Zhang H. "An 'off-on' fluorescent chemosensor of selectivity to Cr^{3+} and its application to MCF-7 cells". *Tetrahedron* 67, 7096-7100 (2011c).

Li Z., Zhang L., Li X., Guo Y., Ni Z., Chen J., Wei L., Yu M. "A fluorescent color/intensity changed chemosensor for Fe^{3+} by photo-induced electron transfer (PET) inhibition of fluoranthene derivate". *Dyes and Pigments*, 94, 60-65(2012).

Li H., Li L., Yin B. "Highly selective fluorescent chemosensor for Fe^{3+} detection based on diaza-18-crown-6 ether appended with dual coumarins". *Inorganic Chemistry Communications*, In Press, Accepted Manuscript, Available online 15 January (2014a).

Li C.-Y., Zou C.-X., Li Y.-F., Tang J.-L., Weng C. "A new rhodamine-based fluorescent chemosensor for Fe^{3+} and its application in living cell imaging". *Dyes and Pigments* 104, 110-115 (2014b).

- Li Z.**, Zhou Y., Yin K., Yu Z., Li Y., Ren J. "A new fluorescence "turn-on" type chemosensor for Fe^{3+} based on naphthalimide and coumarin". *Dyes and Pigments*, In Press, Accepted Manuscript, Available online 8 January (2014c).
- Libes S.M.** "An introduction to Marine Biogeochemistry". Ed. John Wiley & Sons (United States of America) (1992).
- Lieu P.T.**, Heiskala M., Peterson P.A., Yang Y. "The roles of iron in health and disease". *Molecular Aspects of Medicine* 22, 1-87 (2001).
- Lin J.G.**, Chen S.Y., Su C.R. "Assessment of sediment toxicity by metal speciation in different particle-size fractions of river sediment". *Water Science and Technology* 47, 233-241 (2003).
- Lin W.**, Long L., Yuan L., Cao Z., Feng J. "A novel ratiometric fluorescent Fe^{3+} sensor based on a phenanthroimidazole chromophore". *Analytica Chimica Acta* 634, 262-266 (2009).
- Ling L.-C.** y Juang R.-S. "Ion-exchange equilibria of Cu(II) and Zn(II) from aqueous solutions with Chelex 100 and Amberlite IRC 748 resins". *Chemical Engineering Journal* 112, 211-218 (2005).
- Linnaeus C.** "Tomus I. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis". Editio decima, reformata. Holmiae. (Laurentii Salvii), [1-4], 1-824 (1758).
- Liu X.**, He D., Ma M. "Transfer and separation of Cd(II) chloride species from Fe(III) by a hybrid liquid membrane containing tri-n-octylamine-secondary octylalcohol-kerosene". *Chemical Engineering Journal* 133, 265-272 (2007a).
- Liu Y.**, Zhang N., Chen Y., Wang L.-H. "Fluorescence sensing and binding behavior of aminobenzenesulfonamidoquinolino- β -cyclodextrin to Zn^{2+} ". *Organic Letters* 9, 315-318 (2007b).
- Liu R.** y Liang P. "Determination of trace lead in water samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry after preconcentration with nanometer titanium dioxide immobilized on silica gel". *Journal of Hazardous Materials* 152, 166-171 (2008).
- Liu F.** y Wang W.-X. "Metallothionein-like proteins turnover, Cd and Zn biokinetics in the dietary Cd-exposed scallop *Chlamys nobilis*". *Aquatic Toxicology* 105, 361-368 (2011).
- Liu S.-R.** y Wu S.-P. "New water-soluble highly selective fluorescent chemosensor for Fe(III) ions and its application to living cell imaging". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 171-172, 1110-1116 (2012).
- Liu L.**, He B., Yun Z., Sun J., Jiang G. "Speciation analysis of arsenic compounds by capillary electrophoresis on-line coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry using a novel interface". *Journal of Chromatography A* 1304, 227-233 (2013a).
- Liu J.**, Xie Y.-Q., Lin Q., Shi B.-B., Zhang P., Zhang Y.-M., Wei T.-B. "Dipodal fluorescent chemosensor for Fe^{3+} and resultant complex as a chemosensor for fluoride". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 186, 657-665 (2013b).
- Liu X.**, Jia H., Wang L., Qi H., Ma W., Hong W., Guo J., Yang M., Sun Y., Li Y.-F. "Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in concurrently monitored surface seawater and sediment along Dalian coast after oil spill". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 90, 151-156 (2013c).

- Locatelli** C. y Torsi G. "Determination of Se, As, Cu, Pb, Cd, Zn and Mn by anodic and cathodic stripping voltammetry in marine environmental matrices in the presence of reciprocal interference. Proposal of a new analytical procedure". *Microchemical Journal* 65, 293-303 (2000).
- López-López** J.A., Mendiguchía C., Pinto J.J., Moreno C. "Liquid membranes for quantification and speciation of trace metals in natural waters". *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29, 645-653 (2010).
- López-López** J.A., García-Vargas M., Moreno C. "A new analytical method for selective pre-concentration of free silver in estuarine waters using liquid membranes". *Talanta* 108, 7-10 (2013).
- López-Sánchez** J.F., Sahuquillo A., Fiedler H.D., Rubio R., Rauret G., Muntau H., Quevauviller Ph. "CRM 601, a stable material for its extractable content of heavy metals". *Analyst* 123, 1675-1677 (1998).
- Lors** C., Tiffreau C., Laboudigue A. "Effects of bacterial activities on the release of heavy metals from contaminated dredged sediments". *Chemosphere* 56, 619-630 (2004).
- Loska** K., Cebula J., Pelczar J., Wiechula D., Kwapulinski J. "Use of enrichment, and contamination factors together with geoaccumulation indexes to evaluate the content of Cd, Cu, and Ni in the Rybnik water Reservoir in Poland". *Water, Air and Soil Pollution* 93, 347-365 (1997).
- Lovejoy** D.B. y Richardson D.R. "Novel "hybrid" iron chelators derived from aroylhydrazones and thiosemicarbazones demonstrate selective antiproliferative activity against tumor cells". *Blood* 100, 666-676 (2002).
- Lozada-Zarate** J.E. "Determinación de la concentración de metales en *Cyprinus Carpio*, Linnaeus 1758 (carpa común) de la Laguna de Metztitlán, Hidalgo, México". Tesis Doctoral. Área Académica de Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México (2007).
- Lucas** J.-P., Bellanger L., Le Strat Y., Le Tertre A., Glorennec P., Le Bot B., Etchevers A., Mandin C., Sébille V. "Source contributions of lead in residential floor dust and within-home variability of dust lead loading". *Science of the Total Environment* 470-471, 768-779 (2014).
- Luoma** S.N. y Bryan J.W. "A statistical assessment of the form of trace metals in oxidized estuarine sediments employing chemical extractants". *Science of the Total Environment* 17, 165-196 (1978).
- Lv** J., Yang Q., Jiang J., Chung T.-S. "Exploration of heavy metal ions transmembrane flux enhancement across a supported liquid membrane by appropriate carrier selection". *Chemical Engineering Science* 62, 6032-6039 (2007).
- Ma** M., Chen B., Luo X., Tan H., He D., Xie Q., Yao S. "Study on the transport selectivity and kinetics of amino acids through di(2-ethylhexyl) phosphoric acid-kerosene bulk liquid membrane". *Journal of Membrane Science* 234, 101-109 (2004).
- Ma** L.-J., Yan Y., Chen L., Cao W., Li H., Yang L., Wu Y. "A fluorescence reagent for the highly selective recognition and separation of lead ion(II) from aqueous solutions". *Analytica Chimica Acta* 751, 135-139 (2012a).

- Ma X.**, Liu J., Du Y., Wei G., Wei D. "Highly sensitive and selective chemosensor for Cu detection based on a N-propargyl rhodamine 6G-hydrazide derivative". *Science China Chemistry* 55, 626-631 (2012b).
- Magnier A.**, Billon G., Louis Y., Baeyens W., Elskens M. "On the lability of dissolved Cu, Pb and Zn in freshwater: Optimization and application to the Deûle (France)". *Talanta* 86, 91-98 (2011).
- Mahajan R.K.**, Kaur I., Lobana T.S. "A mercury(II) ion-selective electrode based on neutral salicylaldehyde thiosemicarbazone". *Talanta* 59, 101-105 (2003).
- Mahajan R.K.**, Walia T.P.S., Sumanjit Lobana T.S. "Cyclopentanone thiosemicarbazone, a new complexing agent for copper determination in biological samples by adsorptive stripping voltammetry". *Analytical Sciences* 22, 389-392 (2006).
- Mahmoud M.E.**, Yakout A.A., Ahmed S.B., Osman M.M. "Speciation, selective extraction and preconcentration of chromium ions via alumina-functionalized-isatin-thiosemicarbazone". *Journal of Hazardous Materials* 158, 541-548 (2008).
- Malik A.K.**, Kaur V., Kumar S. "Chapter 22 - Metal Speciation". *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications* (2012).
- Manahan S.E.** "Environmental chemistry" (Ninth Edition). CRC Press, Boca Raton: Taylor & Francis Group (2010).
- Mandal A.K.**, Suresh M., Suresh E., Mishra S.K., Mishra S., Das A. "A chemosensor for heavy-transition metal ions in mixed aqueous-organic media". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 145, 32-38 (2010).
- Manivannan D.** y Biju V.M. "Determination of toxic heavy metals in sea water by FAAS after preconcentration with a novel chelating resin". *Water Science and Technology* 64, 803-808 (2011).
- Marchese J.** y Campderrós M. "Mass transfer of cadmium ions in a hollow-fiber module by pertraction". *Desalination* 164, 141-149 (2004a).
- Marchese J.**, Valenzuela F., Basualto C., Acosta A. "Transport of molybdenum with Alamine 336 using supported liquid membrane". *Hydrometallurgy* 72, 309-317 (2004b).
- Marcus S.R.** y Dharmalingam M. "Chapter 6 - Iron, Oxidative Stress and Diabetes"; en: "Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants", 51-64 (2014).
- Marín-Galván R.** "Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas". Ed. Díaz de Santos (2003).
- Markert B.** "Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 21 (SUPPL. 1), 77-82 (2007).
- Marmolejo-Rodríguez A.J.**, Prego R., Meyer-Willerer A., Shumilin E., Cobelo-García A. "Total and labile metals in surface sediments of the tropical river-estuary system of Marabasco (Pacific coast of Mexico): Influence of an iron mine". *Marine Pollution Bulletin* 55, 459-468 (2007).
- Marshall S.J.** "Hydrology". *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences* (2013).

- Martín-Díaz** M.L., Riba I., Casado-Martínez M.C., Del Valls A. "Biodisponibilidad de metales en sedimentos de estuarios españoles utilizando *Carcinus maenas* bioavailability of metals in sediments from Spanish estuarios using *Carcinus maenas*". *Ciencias Marinas* 32, 412-420 (2006).
- Martínez-Fernández** M., Barciela-Alonso M.C., Moreda-Piñeiro A., Bermejo-Barrera P. "Matrix solid phase dispersion-assisted BCR sequential extraction method for metal partitioning in surface estuarine sediments". *Talanta* 83, 840-849 (2011).
- Mashahadizadeh** M.H., Mohyaddini R., Shamsipur M. "Selective and efficient liquid membrane transport of Au(III) by tetrathia-12-crown-4 as a specific carrier". *Separation and Purification Technology* 39, 161-166 (2004).
- Mayes** W.M., Jarvis A.P., Burke I.T., Walton M., Feigl V., Klebercz O., Gruiz K. "Dispersal and attenuation of trace contaminants downstream of the Ajka bauxite residue (Red Mud) depository failure, Hungary". *Environmental Science and Technology* 45, 5147-5155 (2011).
- Mays** D.E. y Hussam A. "Voltammetric methods for determination and speciation of inorganic arsenic in the environment-A review". *Analytica Chimica Acta* 646, 6-16 (2009).
- McCauley** D.J., Degraeve G.M., Linton T.K. "Sediment quality guidelines and assessment: Overview and research needs". *Environmental Science and Policy* 3 (SUPPL. 1), 133-144 (2000).
- McDonagh** C., Burke C.S., MacCraith B.D. "Optical Chemical Sensors". *Chemical Reviews* 108, 400-422 (2008).
- Mehdinia** A. y Aziz-Zanjani M.O. "Advances for sensitive, rapid and selective extraction in different configurations of solid-phase microextraction". *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 51, 13-22 (2013).
- Melita** L. y Popescu M. "Removal of Cr(VI) from industrial water effluents and surface waters using activated composite membranes". *Journal of Membrane Science* 312, 157-162 (2008).
- Mendiguchía** C., Moreno C., García-Vargas M. "Determination of copper in seawater based on a liquid membrane preconcentration system". *Analytica Chimica Acta* 460, 35-40 (2002).
- Meng** X.-L., Zhang X., Yao J.-S., Zhang J.-J., Ding B.-Y. "Fluorescence and fluorescence imaging of two Schiff derivatives sensitive to Fe³⁺ induced by single- and two-photon excitation". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 176, 488-496 (2013).
- Mesquita** R.B.R., Fernandes S.M.V., Rangel A.O.S.S. "A flow system for the spectrophotometric determination of lead in different types of waters using ion-exchange for pre-concentration and elimination of interferences". *Talanta* 62, 395-401 (2004).
- Mester** Z. y Sturgeon R. "Trace element speciation using solid phase microextraction". *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 60, 1243-1269 (2005).
- Meyer** P.A., Brown M.J., Falk H. "Global approach to reducing lead exposure and poisoning". *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 659, 166-175 (2008).
- Meyer** D., Prien R.D., Dellwig O., Connelly D.P., Schulz-Bull D.E. "In situ determination of iron(II) in the anoxic zone of the central Baltic Sea using ferene as spectrophotometric reagent". *Marine Chemistry* 130-131, 21-27 (2012).

- Michalke** B. "Element speciation definitions, analytical methodology and some examples". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 122-139 (2003).
- Mihaljevič** M., Ettler V., Strnad L., Šebek O., Vonásek F., Drahotka P., Rohovec J. "Isotopic composition of lead in Czech coals". *International Journal of Coal Geology* 78, 38-46 (2009).
- Miller** J.N. y Miller J.C. "Estadística y Quimiometría para Química Analítica". Cuarta Edición. Pearson Educación (Madrid) (2002).
- Minganti** V., Capelli R., Drava G., De Pellegrini R. "Solubilization and methylation of HgS, PbS, and SnS by iodomethane, a model experiment for the aquatic environment". *Chemosphere* 67, 1018-1024 (2007).
- Minhas** F.T., Memon S., Bhanger M.I. "Transport of Hg(II) through bulk liquid membrane containing calix[4]arene thioalkyl derivative as a carrier". *Desalination* 262, 215-220 (2010).
- Minhas** F.T., Memon S., Qureshi I., Mujahid M., Bhanger M.I. "Facilitated kinetic transport of Cu(II) through a supported liquid membrane with calix[4]arene as a carrier". *Comptes Rendus Chimie* (Article in Press) (2013).
- Ministerio de Fomento:** "Informe sobre el abordaje de los buques "Ciudad de Ceuta" y "Ciudad de Tánger" en las proximidades de la Bahía de Algeciras, el día 16 de Julio de 2000". Comisión Permanente de Investigación de Siniestros Marítimos. Dirección General de la Marina Mercante (2000a).
- Ministerio de Fomento:** "Informe sobre el abordaje de los buques "Mar Rocío" y "SKS Trinity" en las cercanías de la Bahía de Algeciras, el día 16 de Agosto de 2000". Comisión Permanente de Investigación de Siniestros Marítimos. Dirección General de la Marina Mercante (2000b).
- Ministerio de Fomento:** "Informe final sobre la colisión del buque "Euroferrys Pacífica" contra el muelle de "La Galera" en el puerto de Algeciras, el día 18 de Junio de 2001". Comisión Permanente de Investigación de Siniestros Marítimos. Dirección General de la Marina Mercante (2001a).
- Ministerio de Fomento:** "Informe sobre la colisión de los buques "Indalo" y "Al Mansour" en las proximidades de la Bahía de Algeciras, el día 5 de Agosto de 2001". Comisión Permanente de Investigación de Siniestros Marítimos. Dirección General de la Marina Mercante (2001b).
- Ministerio de Fomento:** "Informe sobre el accidente del buque "Spabunker Cuatro" en la Bahía de Algeciras, el día 21 de Enero de 2003". Comisión Permanente de Investigación de Siniestros Marítimos. Dirección General de la Marina Mercante. Ministerio de Fomento (2003).
- Ministerio de Fomento:** "Informe sobre el abordaje de los buques "Atlas" y "Avemar Dos" a la salida del Puerto de Algeciras, el día 28 de Noviembre de 2006". Comisión Permanente de Investigación de Siniestros Marítimos. Dirección General de la Marina Mercante (2006).
- Ministerio de Fomento:** "Informe sobre la varada del buque "Sierra Nava" en la Bahía de Algeciras, el día 28 de Enero de 2007". Comisión Permanente de Investigación de Siniestros Marítimos. Dirección General de la Marina Mercante (2007).

- Miranda** K., Dionísio A.G.G., Pessoa Neto O.D., Gomes M.S., Pereira-Filho E.R. "Determination of Cd levels in smoke condensate of Brazilian and Paraguayan cigarettes by Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry (TS-FF-AAS)". *Microchemical Journal* 100, 27-30 (2012).
- Miravet** R., Hernández-Nataren E., Sahuquillo A., Rubio R., López-Sánchez J.F. "Speciation of antimony in environmental matrices by coupled techniques". *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 29, 28-39 (2010).
- Misic** C. y Harriagueç A.C. "Organic matter characterisation and turnover in the sediment and seawater of a tourist harbour". *Marine Environmental Research* 68, 227-235 (2009).
- Mitra** A., Mittal A.K., Rao C.P. "Carbohydrate assisted fluorescence turn-on gluco-imino-anthracenyl conjugate as a Hg(II) sensor in milk and blood serum milieu". *Chemical Communications* 47, 2565-2567 (2011).
- Mohamed** N.A., Mohamed R.R., Seoudi R.S. "Synthesis and characterization of some novel antimicrobial thiosemicarbazone O-carboxymethyl chitosan derivatives". *International Journal of Biological Macromolecules* 63, 163-169 (2014).
- Mohammad** B., Ure A.M., Reglinski J., Littlejohn D. "Speciation of antimony in natural waters: the determination of Sb(III) and Sb(V) by continuous flow hydride generation-atomic absorption spectrometry". *Chemical Speciation and Bioavailability* 33, 117-122 (1990).
- Mohan** M., Gupta M.P., Chandra L., Jha N.K. "Synthesis, characterization and antitumour properties of some metal(II) complexes of 2-pyridinecarboxaldehyde 2'-pyridylhydrazone and related compounds". *Inorganica Chimica Acta* 151, 61-68 (1988).
- Mohapatra** P.K., Lakshmi D.S., Bhattacharyya A., Manchanda V.K. "Evaluation of polymer inclusion membranes containing crown ethers for selective cesium separation from nuclear waste solution". *Journal of Hazardous Materials* 169, 472-479 (2009).
- Moldoveanu** S.C. y David V. "Chapter 1 - Basic Information about HPLC". *Essentials in Modern HPLC Separations*, 1-51 (2013).
- Molinari** R., Poerio T., Cassano R., Picci N., Argurio P. "Copper(II) removal from wastewaters by a new synthesized selective extractant and SLM viability". *Industrial and Engineering Chemistry Research* 43, 623-628 (2004).
- Mongay** C. y Cerdá V. "A Britton-Robinson buffer of known ionic strength". *Annali di Chimica* 64, 23 (1977).
- Monser** L. y Adhoum N. "Tartrazine modified activated carbon for the removal of Pb(II), Cd(II) and Cr(III)". *Journal of Hazardous Materials* 161, 263-269 (2009).
- Montgomery** D.R., Zabowski D., Ugolini F.C., Hallberg R.O., Spaltenstein H. "Soils, watershed processes, and marine sediments". *International Geophysics* 72, 159-194 (2000).
- Montgomery** D.C. "Diseño y análisis de experimentos", Ed. Grupo Editorial Iberoamericana, S.A., México. (2001).
- Morales** R., López-Sánchez J.F., Rubio R. "Selenium speciation by capillary electrophoresis". *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 27, 183-189 (2008).

- Morales-Caselles C.**, Kalman J., Riba I., DelValls T.A. "Comparing sediment quality in Spanish littoral areas affected by acute (Prestige, 2002) and chronic (Bay of Algeciras) oil spills". *Environmental Pollution* 146, 233-240 (2007).
- Morales-Caselles C.**, Riba I., Sarasquete C., DelValls, T.A. "The application of a weight of evidence approach to compare the quality of coastal sediments affected by acute (Prestige 2002) and chronic (Bay of Algeciras) oil spills". *Environmental Pollution* 156, 394-402 (2008a).
- Morales-Caselles C.**, Kalman J., Micaelo C., Ferreira A.M., Vale C., Riba I., DelValls T.A. "Sediment contamination, bioavailability and toxicity of sediments affected by an acute oil spill: Four years after the sinking of the tanker Prestige (2002)". *Chemosphere* 71, 1207-1213 (2008b).
- Morel F.M.M.** "Principles of Aquatic Chemistry". Ed. Wiley-Interscience (United States of America) (1983).
- Morell I.** y Hernández F. "El agua en Castellón: un reto para el siglo XXI". Universidad Jaume I. Servicio de Comunicación y Publicaciones (2001).
- Moriguchi T.**, Yano K., Tahara M., Yaguchi K. "Metal-modified silica adsorbents for removal of humic substances in water". *Journal of Colloid and Interface Science* 283, 300-310 (2005).
- Morillo J.**, Usero J., Gracia I. "Heavy metal distribution in marine sediments from the southwest coast of Spain". *Chemosphere* 55, 431-442 (2004).
- Morillo J.**, Usero J., Gracia I. "Potential mobility of metals in polluted coastal sediments in two bays of southern Spain". *Journal of Coastal Research* 23, 352-361 (2007).
- Morillo J.** y Usero J. "Trace metal bioavailability in the waters of two different habitats in Spain: Huelva estuary and Algeciras Bay". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 851-859 (2008).
- Mortaheb H.R.**, Kosuge H., Mokhtarani B., Amini M.H., Banihashemi H.R. "Study on removal of cadmium from wastewater by emulsion liquid membrane". *Journal of Hazardous Materials* 165, 630-636 (2009).
- Mota A.M.**, Pinheiro J.P., Simões Gonçalves M.L. "Electrochemical methods for speciation of trace elements in marine waters. Dynamic aspects". *Journal of Physical Chemistry A* 116, 6433-6442 (2012).
- Muller G.** "Schwermetalle in den sedimenten des Rheins-Veränderungen seitt 1971". Umschan 79, 778-783 (1979).
- Muñoz-Olivas R.** y Cámara C. "Speciation related to human health". En "Trace element speciation for environment, food and health", Ebdon L., Pitts L., Cornelis R., Crews H., Donard O.F.X., Quevauviller Ph. The Royal Society of Chemistry (2001).
- Muthuraman G.**, Teng T.T., Leh C.P., Norli I. "Use of bulk liquid membrane for the removal of chromium(VI) from aqueous acidic solution with tri-n-butyl phosphate as a carrier". *Desalination* 249, 884-890 (2009).
- Mzimela H.M.**, Wepener V., Cyrus D.P. "Seasonal variation of selected metals in sediments, water and tissues of the groovy Mollet, Liza dumerelli (Mugilidae) from the Mhlathuze Estuary, South Africa". *Marine Pollution Bulletin* 46, 659-676 (2003).

- Nagles E.**, Arancibia V., Rojas C., Segura R. "Nafion-mercury coated film electrode for the adsorptive stripping voltammetric determination of lead and cadmium in the presence of pyrogallol red". *Talanta* 99, 119-124 (2012).
- Namiesnik J.** y Szefer P. "Analytical Measurements in Aquatic Environments". CRC Press, Taylor & Francis Group (UK) (2010).
- Narayanaswamy R.** y Wolfbeis O.S. "Optical Sensors: Industrial, Environmental and Diagnostic Applications". Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, Springer (Alemania) (2004).
- Narayanaswamy N.** y Govindaraju T. "Aldazine-based colorimetric sensors for Cu^{2+} and Fe^{3+} ". *Sensors and Actuators B: Chemical* 161, 304-310 (2012).
- Narin I.**, Soylak M., Elçi L., Doğan M. "Determination of trace metal ions by AAS in natural water samples after preconcentration of pyrocatechol violet complexes on an activated carbon column". *Talanta* 52, 1041-1046 (2000).
- Narin I.**, Soylak M., Kayakirilmaz K., Elci L., Dogan M. "Preparation of a chelating resin by immobilizing 1-(2-pyridylazo) 2-naphtol on Amberlite XAD-16 and its application of solid phase extraction of Ni(II), Cd(II), Co(II), Cu(II), Pb(II), and Cr(III) in natural water samples". *Analytical Letters* 36, 641-658 (2003).
- Natarajan S.** y Mathews R. "Modeling and proposed mechanism of two radical scavengers through docking to curtail the action of ribonucleotide reductase". *Journal of Biophysics and Structural Biology* 3, 38-48 (2011).
- Ndungù K.**, Franks R.P., Bruland K.W., Flegal A.R. "Organic complexation and total dissolved trace metal analysis in estuarine waters: Comparison of solvent-extraction graphite furnace atomic absorption spectrometric and chelating resin flow injection inductively coupled plasma-mass spectrometric analysis". *Analytica Chimica Acta* 481, 127-138 (2003).
- Ndungù K.**, Hurst M.P., Bruland K.W. "Comparison of copper speciation in estuarine water measured using analytical voltammetry and supported liquid membrane techniques". *Environmental Science and Technology* 39, 3166-3175 (2005).
- Neff J.M.** "Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water". Elsevier Science (2002).
- Nemati K.**, Bakar N.K.A., Abas M.R., Sobhanzadeh E. "Speciation of heavy metals by modified BCR sequential extraction procedure in different depths of sediments from Sungai Buloh, Selangor, Malaysia". *Journal of Hazardous Materials* 192, 402-410 (2011).
- Nezhadali A.**, Hakimi M., Heydari M. "Competitive bulk liquid membrane transport and extraction of Cu(II), Ni(II), Zn(II) and Mn(II) cations using 5-methyle-4[thiophen-2-yl-methylen-amino]-3-thio-oxo-1,2,4-triazol-5-one and phthalic dicarboxaldehyde". *E-Journal of Chemistry* 5, 52-57 (2008).
- Nezhadali A.** "Selective transport of Ag(I) ion across a bulk liquid and polymer membranes incorporated with di-N-benzylated O_3N_2 donor macrocycles". *Chinese Chemical Letters* 21, 1111-1114 (2010).

- Nezhadali** A. y Rabani N. "Competitive bulk liquid membrane transport of Co(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Ag(I), Cu(II) and Mn(II), cations using 2,2'-dithio(bis)benzothiazole as carrier". *Chinese Chemical Letters* 22, 88-92 (**2011**).
- Nfor** E.N., Husian A., Majoumo-Mbe F., Njah I.N., Offiong O.E., Bourne S.A. "Synthesis, crystal structure and antifungal activity of a Ni(II) complex of a new hydrazone derived from antihypertensive drug hydralazine hydrochloride". *Polyhedron* 63, 207-213 (**2013**).
- Niessen** W.M.A. "Chapter 10 - Combined techniques". *Journal of Chromatography Library* 69 (C), 403-430 (**2004**).
- Ninan** S., Varadarajan A., Jadhav S.B., Kulkarni A.J., Malve S.P. "Camphor-3-thioxo-2-oxime as an analytical reagent for extractive spectrophotometric determination and separation of lead". *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 55, 825-831 (**1999**).
- Nirel** P.M.V. y Morel, F.M.M. "Pitfalls of sequential extractions". *Water Research* 24, 1055-1056 (**1990**).
- Nitschke** W., McGlynn S.E., Milner-White E.J., Russell M.J. "On the antiquity of metalloenzymes and their substrates in bioenergetics". *Biochimica et Biophysica Acta* 1827, 871-881 (**2013**).
- Noble** R.D. y Way J.D. "Liquid Membranes. Theory and Applications". *ACS Symposium Series*, 347, American Chemical Society, Washington D.C. (**1987**).
- Noiré** M.H. y Duréault B. "A ferrous ion optical sensor based on fluorescence quenching". *Sensors and Actuators: B. Chemical* 29, 386-391 (**1995**).
- Nomngongo** P.N., Catherine Ngila J., Msagati T.A.M., Moodley B. "Preconcentration of trace multi-elements in water samples using Dowex 50W-x8 and Chelex-100 resins prior to their determination using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-OES)". *Physics and Chemistry of the Earth* 66, 83-88 (**2013**).
- Nordberg** M., Templeton D.M., Andersen O., Duffus J.H. "Glossary of terms used in ecotoxicology (IUPAC Recommendations 2009)". *Pure and Applied Chemistry* 81, 829-970 (**2009**).
- Nosrati** S., Jayakumar N.S., Hashim M.A. "Extraction performance of chromium(VI) with emulsion liquid membrane by Cyanex 923 as carrier using response surface methodology". *Desalination* 266, 286-290 (**2011**).
- Nunes** S.P. y Peinemann K.V. "Membrane Technology in the Chemical Industry" (First Edition). Ed. Wiley-VCH, Weinheim (Alemania) (**2001**).
- Oberta** A., Wasilewski J., Wódzki R. "Structure and transport properties of polymer inclusion membranes for Pb(II) separation". *Desalination* 271, 132-138 (**2011**).
- Oleinikova** M., González C., Valiente M., Muñoz M. "Selective transport of zinc through activated composite membranes containing di(2-ethylhexyl)dithiophosphoric acid as a carrier". *Polyhedron* 18, 3353-3359 (**1999**).
- Olías** M., Moral F., Galván L., Cerón J.C. "Groundwater contamination evolution in the Guadiamar and Agrio aquifers after the Aznalcóllar spill: assessment and environmental implications". *Environmental monitoring and assessment* 184, 3629-3641 (**2012**).

- Orellana** G. y Moreno-Bondi M.C. "Frontiers in Chemical Sensors: Novel Principles and Techniques". Springer: Berlin, Heidelberg, New York (2005).
- Orozco-Barrenetxea** C., Pérez-Serrano A., González-Delgado M.N., Rodríguez-Vidal F.J., Alfayate-Blanco J.M. "Contaminación ambiental: una visión desde la Química" (Primera edición, quinta reimpresión). International Thomson Editores, Paraninfo (Madrid) (2008).
- Ortiz-Bolsico** C., Torres-Lapasio J.R., Ruiz-ángel M.J., García-álvarez-Coque M.C. "Comparison of two serially coupled column systems and optimization software in isocratic liquid chromatography for resolving complex mixtures". *Journal of Chromatography A* 1281, 94-105 (2013).
- Oter** O., Ertekin K., Kirilmis C., Koca M., Ahmedzade M. "Characterization of a newly synthesized fluorescent benzofuran derivative and usage as a selective fiber optic sensor for Fe(III)". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 122, 450-456 (2007a).
- Oter** O., Ertekin K., Kilincarslan R., Ulusoy M., Cetinkaya B. "Photocharacterization of a novel fluorescent Schiff Base and investigation of its utility as an optical Fe³⁺ sensor in PVC matrix". *Dyes and Pigments* 74, 730-735 (2007b).
- Othman** N., Mat H., Goto M. "Separation of silver from photographic wastes by emulsion liquid membrane system". *Journal of Membrane Science* 282, 171-177 (2006).
- Oyarzún** J. y Oyarzun R. "Minería sostenible: principios y prácticas". Manual. Ediciones GEMM-Aula2pontonet (2011).
- Öztürk** M., Bizsel N., Steinnes E. "Iron speciation in eutrophic and oligotrophic Mediterranean coastal waters, impact of phytoplankton and protozoan blooms on iron distribution". *Marine Chemistry* 81, 19-36 (2003).
- Páez-Hernández** M.E., Aguilar-Arteaga K., Valiente M., Ramírez-Silva M.T., Romero-Romo M., Palomar-Pardavé M. "Facilitated transport of Hg(II) through novel activated composite membranes". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 380, 690-697 (2004).
- Pal** A. "Copper toxicity induced hepatocerebral and neurodegenerative diseases: An urgent need for prognostic biomarkers". *NeuroToxicology* 40, 97-101 (2014).
- Palanimuthu** D. y Samuelson A.G. "Dinuclear zinc bis(thiosemicarbazone) complexes: Synthesis, in vitro anticancer activity, cellular uptake and DNA interaction study". *Inorganica Chimica Acta* 408, 152-161 (2013).
- Pamuk** M. y Algi F. "Synthesis of a novel on/off fluorescent cadmium(II) probe". *Tetrahedron Letters* 53, 7010-7012 (2012).
- Panagopoulos** C.N., Georgiou E.P., Markopoulos C. "Corrosion and wear of zinc in various aqueous based environments". *Corrosion Science* 70, 62-67 (2013).
- Panja** S., Mohapatra P.K., Tripathi S.C., Manchanda V.K. "Studies on uranium(VI) pertraction across a N,N,N'-tetraoctyldiglycolamide (TODGA) supported liquid membrane". *Journal of Membrane Science* 337, 274-281 (2009).

- Pansini** M. "Natural zeolites as cation exchangers for environmental protection". *Mineralium Deposita* 31, 563-575 (1996).
- Park** C.S., Lee J.Y., Kang E.-J., Lee J.-E., Lee S.S. "A highly selective fluorescent chemosensor for silver(I) in water/ethanol mixture". *Tetrahedron Letters* 50, 671-675 (2009).
- Parthasarathy** N. y Buffle J. "Capabilities of supported liquid membranes for metal speciation in natural waters: Application to copper speciation". *Analytica Chimica Acta* 284, 649-659 (1994).
- Parthasarathy** N., Pelletier M., Buffle J. "Hollow fiber based supported liquid membrane: A novel analytical system for trace metals analysis". *Analytica Chimica Acta* 350, 183-195 (1997).
- Parthasarathy** N., Buffle J., Gassama N., Cuenod F. "Speciation of trace metals in waters: Direct selective separation and preconcentration of free metal ion by supported liquid membrane". *Chemia Analityczna* 44, 455-470 (1999).
- Parthasarathy** N., Pelletier M., Buffle J. "The use of permeation liquid membrane (PLM) as an analytical tool for trace metal speciation studies in natural waters". *Journal De Physique. IV : JP* 107 (II), 1021-1024 (2003).
- Parthasarathy** N., Pelletier M., Buffle J. "Permeation liquid membrane for trace metal speciation in natural waters: Transport of liposoluble Cu(II) complexes". *Journal of Chromatography A* 1025, 33-40 (2004).
- Pei** L., Wang L., Guo W., Zhao N. "Study on a novel disphase supplying supported liquid membrane for transport behavior of divalent nickel ions". *Chinese Journal of Chemical Engineering* 20, 633-640 (2012a).
- Pei** L., Wang L., Yu G. "Study on a novel flat renewal supported liquid membrane with D2EHPA and hydrogen nitrate for neodymium extraction". *Journal of Rare Earths* 30, 63-68 (2012b).
- Peijnenburg** W.J.G.M. y Jager T. "Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 63-77 (2003).
- Pemmer** B., Roschger A., Wastl A., Hofstaetter J.G., Wobrauschek P., Simon R., Thaler H.W., Roschger P., Klaushofer K., Strelci C. "Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue". *Bone* 57, 184-193 (2013).
- Peng** J.-F., Liu R., Liu J.-F., He B., Hu X.-L., Jiang G.-B. "Ultrasensitive determination of cadmium in seawater by hollow fiber supported liquid membrane extraction coupled with graphite furnace atomic absorption spectrometry". *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 62, 499-503 (2007a).
- Peng** X., Du J., Fan J., Wang J., Wu Y., Zhao J., Sun S., Xu T. "A selective fluorescent sensor for imaging Cd²⁺ in living cells". *Journal of the American Chemical Society* 129, 1500-1501 (2007b).
- Peng** J.-f., Song Y.-h., Yuan P., Cui X.-y., Qiu G.-l. "The remediation of heavy metals contaminated sediment". *Journal of Hazardous Materials* 161, 633-640 (2009).
- Pérez-Bendito** D. y Rubio S. "Comprehensive Analytical Chemistry". Environmental Analytical Chemistry, Volume 32. Elsevier Science (The Netherlands) (1999).
- Pérez-Conde** C. "Sensores ópticos". Servicio de Publicaciones Universidad de Valencia (1996).

- Periáñez** R. y Pascual-Granged A. "Modelling surface radioactive, chemical and oil spills in the Strait of Gibraltar". *Computers and Geosciences* 34, 163-180 (**2008**).
- Periáñez** R. "Modelling the environmental behaviour of pollutants in Algeciras Bay (south Spain)". *Marine Pollution Bulletin* 64, 221-232 (**2012**).
- Perminova** I.V., Karpouk L.A., Ponomarenko S.A., Hatfield K., Konstantinov A.I., Hertkorn N., Muzafarov A.M. "Controlling aqueous sorption of humic substances on silica gel by directed alkoxysilyl-derivatization of their functionalities". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 396, 224-232 (**2012**).
- Pesavento** M., Alberti G., Biesuz R. "Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review". *Analytica Chimica Acta* 631, 129-141 (**2009**).
- Peterson** R.T. y Lamb, J.D. "Design of macrocyclic carriers for liquid membranes". *ACS Symposium Series*, 642, American Chemical Society, Washington D.C. (**1996**).
- Pickering** L.W.F. "Metal ion speciation - soils and sediments (a review)". *Ore Geology Reviews* 1, 83-146 (**1986**).
- Pickering** L.W.F. "Chemical Speciation in the environment" (Second Edition). Chapter 2: "General strategies for speciation". Ed. Blackwell Science Oxford (UK) (**2002**).
- Pietrzak** M. "Sensors and Bioselective Reagents". *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (**2013**).
- Plan de Calidad Ambiental del Campo de Gibraltar**. Documento Base. Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía (**2001**).
- Plan de Calidad Ambiental del Campo de Gibraltar**. Fase I, Sexto informe, 2005. Estudio de la calidad ambiental del campo de Gibraltar (Medio ambiente acuático y contaminación acústica). Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía (**2005**).
- Plan de Calidad Ambiental del Campo de Gibraltar**. Fase II, Primer informe. "Diagnóstico ambiental del medio acuático y evaluación de la contaminación acústica en el Campo de Gibraltar". Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía (**2006**).
- Plant** J.A. y Raiswell E. "Principles of environmental geochemistry"; en: "Applied Environmental Geochemistry", Ed. Thornton, London, Academic Press, 1-39 (**1983**).
- Plaschke** R., Dal Pont G., Butler E.C.V. "Mercury in waters of the Derwent Estuary - Sample treatment and analysis". *Marine Pollution Bulletin* 34, 177-185 (**1997**).
- Pontes** F.V.M., Carneiro M.C., Vaitsman D.S., Monteiro M.I.C., Neto A.A., Tristão M.L.B. "Investigation of the Grignard reaction and experimental conditions for the determination of inorganic mercury and methylmercury in crude oils by GC-ICP-MS". *Fuel* 116, 421-426 (**2014**).
- Prabhakaran** D. y Subramanian M.S. "A new chelating sorbent for metal ion extraction under high saline conditions". *Talanta* 59, 1227-1236 (**2003a**).

- Prabhakaran** D. y Subramanian M.S. "Selective extraction and sequential separation of actinide and transition ions using AXAD-16-BTBED polymeric sorbent". *Reactive and Functional Polymers* 57, 147-155 (2003b).
- Prabhakaran** R., Palaniappan K., Huang R., Sieger M., Kaim W., Wiswanathamurthi P., Dallemer F., Natarajan K. "Can geometry control the coordination behaviour of 2-hydroxy-1-naphthaldehyde-N(4)-phenylthiosemicarbazone? A study towards its origin". *Inorganica Chimica Acta* 376, 317-324 (2011).
- Pueyo** M., Rauret G., Lück D., Yli-Halla M., Muntau H., Quevauviller Ph., López-Sánchez J.F. "Certification of the extractable contents of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in a freshwater sediment following a collaboratively tested and optimised three-step sequential procedure". *Journal of Environmental Monitoring* 3, 243-250 (2001).
- Pueyo** M., Mateu J., Rigol A., Vidal M., López-Sánchez J.F., Rauret G. "Use of the modified BCR three-step sequential extraction procedure for the study of trace element dynamics in contaminated soils". *Environmental Pollution* 152, 330-341 (2008).
- Pulido-Tofiño** P., Moreno J.M.B.-M., Pérez-Conde M.C. "A flow-through fluorescent sensor to determine Fe(III) and total inorganic iron". *Talanta* 51, 537-545 (2000).
- Pyle** G., Rajotte J.M., Couture P. "Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 287-312 (2005).
- Queirós** C., Silva A.M.G., Lopes S.C., Ivanova G., Gameiro P., Rangel M. "A novel fluorescein-based dye containing a catechol chelating unit to sense iron(III)". *Dyes and Pigments* 93, 1447-1455 (2012).
- Quevauviller** Ph., Ure A.M., Muntau H., Griepink B. "Improvement of analytical measurements within the BCR-programme: single and sequential extraction procedures applied to soil and sediment analysis". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 51, 129-134 (1993).
- Quevauviller** Ph., Rauret G., Muntau H., Ure A.M., Rubio R., López-Sánchez J.F., Fielder H.D., Griepink B. "Evaluation of a sequential extraction procedure for the determination of extractable trace metal contents in sediments". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 349, 808-814 (1994).
- Quevauviller** Ph., Rauret G., López-Sánchez J.F., Rubio R., Ure A.M., Muntau H. "Certification of the trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) following a three-step sequential extraction procedure". *Science of the Total Environment* 205, 223-234 (1997).
- Quevauviller** Ph. "Operationally defined extraction procedures for soil and sediment analysis I. Standarization". *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 17, 289-298 (1998a).
- Quevauviller** Ph. "Operationally defined extraction procedures for soil and sediment analysis II. Certified reference materials". *Trends in Analytical Chemistry* 17, 632-642 (1998b).
- Radojevic** M. y Bashkin V.N. "Practical environmental analysis" (Second Edition). The Royal Society of Chemistry, Cambridge (UK) (2006).

- Rajasimman** M. y Sangeetha R. "Optimization of process parameters for the extraction of chromium(VI) by emulsion liquid membrane using response surface methodology". *Journal of Hazardous Materials* 168, 291-297 (2009).
- Rajasimman** M. y Karthic P. "Application of response surface methodology for the extraction of chromium(VI) by emulsion liquid membrane". *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 41, 105-110 (2010).
- Ramkumar** J., Nayak S.K., Maiti B. "Transport of uranyl ion across a bulk liquid membrane using calixarene and synergistic agents as carriers". *Journal of Membrane Science* 196, 203-210 (2002).
- Ramos-Gómez** J., Martín-Díaz M.L., Delvals T.A. "Acute toxicity measured in the amphipod *Ampelisca brevicornis* after exposure to contaminated sediments from Spanish littoral". *Ecotoxicology* 18, 1068-1076 (2009).
- Ramos-Gómez** J., Viguri J.R., Luque Á., Vale C., Martín-Díaz M.L., Ángel Delvals, T.A. "Sediment-quality assessment using the polychaete *arenicola marina*: Contamination, bioavailability, and toxicity". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61, 578-589 (2011).
- Rashed** M.N. "Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake". *Environment International* 27, 27-33 (2001).
- Rathore** N.S., Leopold A., Pabby A.K., Fortuny A., Coll M.T., Sastre A.M. "Extraction and permeation studies of Cd(II) in acidic and neutral chloride media using Cyanex 923 on supported liquid membrane". *Hydrometallurgy* 96, 81-87 (2009).
- Rauret** G., López-Sánchez J.F., Sahuquillo A., Rubio R., Davidson C.M., Ure A.M., Quevauviller Ph. "Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of the new sediment and soil reference materials". *Journal of Environmental Monitoring* 1, 57-61 (1999).
- Rayner-Canham** G. y Overton T. "Descriptive inorganic chemistry" (Third Edition, second print). Ed. W. H. Freeman and Company, New York (2003).
- Reddy** K.J., Kumar J.R., Ramachandraiah C., Thriveni T., Reddy A.V. "Spectrophotometric determination of zinc in foods using N-ethyl-3-carbazolecarboxaldehyde-3-thiosemicarbazone: Evaluation of a new analytical reagent". *Food Chemistry* 101, 585-591 (2007).
- Reddy** S.A., Reddy K.J., Narayana S.L., Reddy A.V. "Analytical applications of 2,6-diacetylpyridine bis-4-phenyl-3-thiosemicarbazone and determination of Cu(II) in food samples". *Food Chemistry* 109, 654-659 (2008).
- Reddy** T.R., Ramkumar J., Chandramouleeswaran S., Reddy A.V.R. "Selective transport of copper across a bulk liquid membrane using 8-hydroxy quinoline as carrier". *Journal of Membrane Science* 351, 11-15 (2010).
- Reddy** S.A., Reddy K.J., Duk L.K., Reddy A.V. "Evaluation of 2,6-diacetylpyridine bis-4-phenyl-3-thiosemicarbazone as complexing reagent for zinc in food and environmental samples". *Journal of Saudi Chemical Society* (Article in Press) (2012).
- Rehman** S.U., Akhtar G., Chaudry M.A., Ali K., Ullah N. "Transport of Ag^+ through tri-n-dodecylamine supported liquid membranes". *Journal of Membrane Science* 389, 287-293 (2012).

- Reinoso-Maset E.**, Worsfold P.J., Keith-Roach M.J. "The effect of EDTA, NTA and picolinic acid on Th(IV) mobility in a ternary system with natural sand". *Environmental Pollution* 162, 399-405 (2012).
- Reis M.T.A.** y Carvalho J.M.R. "Modelling of zinc extraction from sulphate solutions with bis(2-ethylhexyl)thiophosphoric acid by emulsion liquid membranes". *Journal of Membrane Science* 237, 97-107 (2004).
- Reis A.**, Parker A., Alenção A. "Storage and origin of metals in active stream sediments from mountainous rivers: A case study in the River Douro basin (North Portugal)". *Applied Geochemistry* (Article in Press) (2013).
- Ren H.**, Liu H., Qu J., Berg M., Qi W., Xu W. "The influence of colloids on the geochemical behavior of metals in polluted water using as an example Yongdingxin River, Tianjin, China". *Chemosphere* 78, 360-367 (2010).
- Repetto-Jiménez M.**, Repetto-Kuhn G. "Toxicología fundamental" (Primera Edición) Ed. Díaz de Santos (Madrid) (2009).
- Resina M.**, Fontàs C., Palet C., Muñoz M. "Comparative study of hybrid and activated composite membranes containing Aliquat 336 for the transport of Pt(IV)". *Journal of Membrane Science* 311, 235-242 (2008).
- Riba I.**, Zitko V., Forja J.M., DelValls T.A. "Deriving sediment quality guidelines in the Guadalquivir estuary associated with the Aznalcóllar mining spill: A comparison of different approaches". *Ciencias Marinas* 29, 261-274 (2003).
- Riba I.**, Casado-Martínez C., Forja J.M., Del Valls A. "Sediment quality in the Atlantic Coast of Spain". *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 271-282 (2004).
- Richards R.**, Chaloupka M., Sanò M., Tomlinson R. "Modelling the effects of 'coastal' acidification on copper speciation". *Ecological Modelling* 222, 3559-3567 (2011).
- Riede K.** "Global register of migratory species - from global to regional scales". Final Report of the R&D-Projekt 808 05 081. Federal Agency for Nature Conservation, Bonn (Alemania) (2004).
- Riley J.P.** y Taylor D. "Chelating resins for the concentration of trace elements from sea water and their analytical use in conjunction with atomic absorption spectrophotometry". *Analytica Chimica Acta* 40, 479-485 (1968).
- Rivera-Mancía S.**, Pérez-Neri I., Ríos C., Tristán-López L., Rivera-Espinosa L., Montes S. "The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases". *Chemico-Biological Interactions* 186, 184-199 (2010).
- Roberts D.A.** "Causes and ecological effects of resuspended contaminated sediments (RCS) in marine environments". *Environment International* 40, 230-243 (2012).
- Rodríguez-Riobó R.** "Complejos metálicos con tiosemicarbazonas derivadas de la 2-pirazinaformamida". *Tesis Doctoral*. Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Química Inorgánica (2007).

- Rojas E.**, Herrera L.A., Poirier L.A., Ostrosky-Wegman P. "Are metals dietary carcinogens?". *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 443, 157-181 (**1999**).
- Rojo-Nieto E.**, Garrido-Pérez C., Anfuso-Melfi G., Lopez-Aguayo F., Sales-Marquez D., Perales-Vargas-Machuca J.A. "The Zoning of Semi-Enclosed Bodies of Water According to the Sediment Pollution: The Bay of Algeciras as a Case Example". *Estuaries and Coasts* 34, 1129-1139 (**2011**).
- Roldán G.** y Ramírez J.J. "Fundamentos de limnología neotropical" (Segunda Edición). Editorial Universidad de Antioquia (Colombia) (**2008**).
- Romero R.** y Jönsson J.Å. "Determination of free copper concentrations in natural waters by using supported liquid membrane extraction under equilibrium conditions". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381, 1452-1459 (**2005**).
- Rouhollahi A.**, Zolfonoun E., Salavati-Niasari M. "Effect of anionic surfactant on transport of copper(II) through liquid membrane containing a new synthesis Schiff base". *Separation and Purification Technology* 54, 28-33 (**2007**).
- Rounaghi G. H.**, Ghaemi A., Chamsaz M. "Separation study of some heavy metal cations through a bulk liquid membrane containing 1,13-bis(8-quinolyl)-1,4,7,10,13-pentaoxatridecane". *Arabian Journal of Chemistry* (Article in Press) (**2011**).
- Rounaghi G.**, Mohammadzadeh kakhki R., Eshghi H. "Efficient transport of lead(II) cations in natural water using a liquid membrane system with dicyclohexano-18-crown-6 as carrier". *Arabian Journal of Chemistry* (Article in Press) (**2012**).
- Roychoudhury A.N.** y Starke M.F. "Partitioning and mobility of trace metals in the Blesbokspruit, Impact assessment of dewatering of mine waters in the East Rand, South Africa". *Applied Geochemistry* 21, 1044-1063 (**2006**).
- Rus Pezzi I.** "Estación depuradora de aguas residuales de Algeciras". Dirección General del Agua - Ministerio de Medio Ambiente, Dossier 54 (**2011**).
(<http://www.reteonline.org/images/stories/archivos/portus/pdf/24/Rus%20Pezzi.pdf>)
- Ruyters S.**, Mertens J., Vassilieva E., Dehandschutter B., Poffijn A., Smolders E. "The red mud accident in Ajka (Hungary): plant toxicity and trace metal bioavailability in red mud contaminated soil". *Environmental Science and Technology* 45, 1616-1622 (**2011**).
- Rydberg J.**, Cox M., Musikas C., Choppin G.R. "Solvent Extraction Principles and Practice" (Segunda Edición) Ed. Marcel Dekker, New York (**2004**).
- Sabin L.D.**, Lim J.H., Stolzenbach K.D., Schiff K.C. "Atmospheric dry deposition of trace metals in the coastal region of Los Angeles, California, USA". *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 2334-2341 (**2006**).
- Sabry R.**, Hafez A., Khedr M., El-Hassanin A. "Removal of lead by an emulsion liquid membrane. Part I". *Desalination* 212, 165-175 (**2007**).
- Saf A.O.**, Alpaydin S., Sirit A. "Transport kinetics of chromium(VI) ions through a bulk liquid membrane containing p-tert-butyl calix[4]arene 3-morpholino propyl diamide derivative". *Journal of Membrane Science* 283, 448-455 (**2006**).

- Sahuquillo A.**, López-Sánchez J.F., Rubio R., Rauret G., Thomas E.A., Davidson C.M., Ure A.M. "Use of certified reference materials for extractable trace metals to assess sources of uncertainty in the BCR three-stage sequential extraction procedure". *Analytica Chimica Acta* 382, 317-327 (**1999**).
- Šajn R.**, Halamić J., Peh Z., Galović L., Alijagić J. "Assessment of the natural and anthropogenic sources of chemical elements in alluvial soils from the Drava River using multivariate statistical methods". *Journal of Geochemical Exploration* 110, 278-289 (**2011**).
- Sakan S.M.**, Dordević D.S., Manojlović D.D., Predrag P.S. "Assessment of heavy metal pollutants accumulation in the Tisza river sediments". *Journal of Environmental Management* 90, 3382-3390 (**2009**).
- Sakan S.M.**, Sakan N.M., Dordević D.S. "Trace element study in Tisa River and Danube alluvial sediment in Serbia". *International Journal of Sediment Research* 28, 234-245 (**2013**).
- Salas-Solano O.** y Felten C. "15 - Capillary electrophoresis and bioanalysis". *Separation Science and Technology* 9, 401-424,533 (**2008**).
- Salaün P.**, Bujard F., Berdondini L., Koudelka-Hep M., Buffle J. "Integrated microanalytical system coupling permeation liquid membrane and voltammetry for trace metal speciation. Technical description and optimization". *Electroanalysis* 16, 811-820 (**2004**).
- Salazar-Álvarez G.**, Bautista-Flores A.N., De San Miguel E.R., Muhammed M., De Gyves J. "Transport characterisation of a PIM system used for the extraction of Pb(II) using D2EHPA as carrier". *Journal of Membrane Science* 250, 247-257 (**2005**).
- Saleem M.** y Lee K-H. "Selective fluorescence detection of Cu²⁺ in aqueous solution and living cells". *Journal of Luminescence* 145, 843-848 (**2014**).
- Salomon W.** y Förstner U. "Metals in the hydrocycle". Ed. Springer-Verlag (Alemania) (**1984**).
- Salomons W.** y Baccini P. "Chemical species and metal transport in lakes". Delft Hydraulics Laboratory (The Netherlands) (**1989**).
- Salomons W.** "Adoption of common schemes for single and sequential extraction of trace metal in soils and sediments". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 51, 3-4 (**1993**).
- Samanta S.**, Goswami S., Ramesh A., Das G. "A new fluorogenic probe for solution and intra-cellular sensing of trivalent cations in model human cells". *Sensors and Actuators B: Chemical* 194, 120-126 (**2014**).
- Sammarco P.W.**, Kolian S.R., Warby R.A.F., Bouldin J.L., Subra W.A., Porter S.A. "Distribution and concentrations of petroleum hydrocarbons associated with the BP/Deepwater Horizon Oil Spill, Gulf of Mexico". *Marine Pollution Bulletin* 73, 129-143 (**2013**).
- San Román M.F.**, Bringas E., Ibañez R., Ortiz I. "Liquid membrane technology: Fundamentals and review of its applications". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85, 2-10 (**2010**).
- Sánchez de la Campa A.M.**, Moreno T., de la Rosa J., Alastuey A., Querol X. "Size distribution and chemical composition of metalliferous stack emissions in the San Roque petroleum refinery complex, southern Spain". *Journal of Hazardous Materials* 190, 713-722 (**2011**).

Sánchez O., Peters E., Márquez-Huitzil R., Vega E., Portales G., Valdez M., Azuara D. "Temas sobre restauración ecológica" (Primera Edición). Servicio de Publicaciones del Instituto Nacional de Ecología de México (2005).

Sánchez-Garrido J.C., García-Lafuente J., Sammartino S., Naranjo C., de los Santos F.I., Álvarez-Fanjul E. "Meteorologically-driven circulation and flushing times of the Bay of Algeciras, Strait of Gibraltar". *Marine Pollution Bulletin* 80, 97–106 (2014).

Sánchez-Uria J.E. "Speciation of metals in environment samples". *Química e Industria* 41, 25-34 (1994).

Sandstead H.H. y Au W. "Chapter 47 - Zinc"; en: Nordberg G.F., Fowler B.A., Nordberg M., Friberg L. (Eds.) "Handbook on the Toxicology of Metals" (Third Edition). Academic Press (Elsevier), 925-947 (2007).

Santos-Figueroa L.E., Moragues M.E., Raposo M.M.M., Batista R.M.F., Ferreira R.C.M., Costa S.P.G., Sancenón F., Martínez-Máñez R., Soto J., Ros-Lis J.V. "Synthesis and evaluation of fluorimetric and colorimetric chemosensors for anions based on (oligo)thienyl-thiosemicarbazones". *Tetrahedron* 68, 7179-7186 (2012).

Sanz-Medel A., Costa J.M., Pereiro R. "Atomic Spectrometry". *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (2013).

Sanz-París A., Arrieta-Navarro R., Alberio-Gamboa R. "Capítulo 23 - Enfermedad de Wilson. Dieta controlada en cobre"; en: Bellido-Guerrero D., de Luis-Román D.A. (Eds.) "Manual de nutrición y metabolismo". Ediciones Díaz Santos (Madrid), 289-300 (2006).

Sathyadevi P., Krishnamoorthy P., Alagesan M., Thanigaimani K., Thomas Muthiah P., Dharmaraj N. "Synthesis, crystal structure, electrochemistry and studies on protein binding, antioxidant and biocidal activities of Ni(II) and Co(II) hydrazone complexes". *Polyhedron* 31, 294-306 (2012).

Saxena R., Singh A.K., Sambi S.S. "Synthesis of a chelating polymer matrix by immobilizing Alizarin Red-S on Amberlite XAD-2 and its application to the preconcentration of lead(II), cadmium(II), zinc(II) and nickel(II)". *Analytica Chimica Acta* 295, 199-204 (1994).

Saxena R., Singh A.K., Rathore D.P.S. "Salicylic acid functionalized polystyrene sorbent Amberlite XAD-2. Synthesis and applications as a preconcentrator in the determination of zinc(II) and lead(II) by using atomic absorption spectrometry". *The Analyst* 120, 403-405 (1995).

Saxena R. y Singh A.K. "Pyrocatechol violet immobilized Amberlite XAD-2: Synthesis and metal-ion uptake properties suitable for analytical applications". *Analytica Chimica Acta* 340, 285-290 (1997).

Schlesinger W.H. y Bernhardt E.S. "Chapter 9 - The Oceans" *Biogeochemistry: An Analysis of Global Change (Third Edition)*. Academic Press (Elsevier) (2013).

Schlosser S. "COMETT Advanced Course of Membrane Technology", Module 4, Arcavacata di Rende (Italy) (1993).

Schmidt B.C., Behrens H., Riemer T., Kappes R., Dupree R. "Quantitative determination of water speciation in aluminosilicate glass: A comparative NMR and IR spectroscopic study". *Chemical Geology* 174, 195-208 (2001).

- Seijó Echevarría** M., Del Tóro Déniz R., Martínez Castellanos E., Sherbakov G.A., Rodríguez Moya J.J. "Uses of natural zeolite in the removal of Pb^{2+} from contaminated water". *Ecletica Química* 22, 15-22 (1997).
- Sengupta** B., Sengupta R., Subrahmanyam N. "Copper extraction into emulsion liquid membranes using LIX 984N-C[®]". *Hydrometallurgy* 81, 67-73 (2006).
- Seoáñez-Calvo** M., Varela-Díaz R., Ladaria-Sureda P., Bellas-Velasco E., Fernández-Alonso C.M., Pérez-Bermúdez A., Parafita-Parafita J.M., Berrocal-del Río M., Urquijo-Zamora S., García-Sanz F., Seoáñez-Oliet P. "Manual de contaminación marina y restauración del litoral: contaminación, accidentes y catástrofes, agresiones a las costas y soluciones. El turismo de costa, la pesca, la ordenación y la gestión del litoral" Ed. Mundi-Prensa Libros (Madrid) (2000a).
- Seoáñez-Calvo** M., Bellas-Velasco E., Ladaria-Sureda P., Seoáñez-Oliet P. "Tratado de reciclado y recuperación de productos de los residuos". Ed. Mundi-Prensa Libros (2000b).
- Shailesh** S., Pathak P.N., Mohapatra P.K., Manchanda V.K. "Transport studies of uranium across a supported liquid membrane containing N,N-di(2-ethylhexyl) isobutyramide (D2EHIBA) as the carrier". *Journal of Membrane Science* 272, 143-151 (2006).
- Shams** E., Babaei A., Soltaninezhad M. "Simultaneous determination of copper, zinc and lead by adsorptive stripping voltammetry in the presence of Morin". *Analytica Chimica Acta* 501, 119-124 (2004).
- Shamsipur** M., Hashemi O.R., Lippolis V. "A supported liquid membrane system for simultaneous separation of silver(I) and mercury(II) from dilute feed solutions". *Journal of Membrane Science* 282, 322-327 (2006).
- Shamsipur** M., Davarkhah R., Khanchi A.R. "Facilitated transport of uranium(VI) across a bulk liquid membrane containing thenoyltrifluoroacetone in the presence of crown ethers as synergistic agents". *Separation and Purification Technology* 71, 63-69 (2010).
- Shamsipur** M., Sadeghi M., Garau A., Lippolis V. "An efficient and selective fluorescent chemical sensor based on 5-(8-hydroxy-2-quinolinylmethyl)-2,8-dithia-5-aza-2,6-pyridinophane as a new fluoroionophore for determination of iron(III) ions. A novel probe for iron speciation". *Analytica Chimica Acta* 761, 169-177 (2013).
- Sharma** R.K., Agrawal M., Marshall F.M. "Heavy metal (Cu, Zn, Cd, and Pb) contamination of vegetables in urban India, A case study in Varanasi". *Environmental Pollution* 154, 254-263 (2008).
- Sharma** R.K. y Pant P. "Preconcentration and determination of trace metal ions from aqueous samples by newly developed gallic acid modified Amberlite XAD-16 chelating resin". *Journal of Hazardous Materials* 163, 295-301 (2009).
- She** M., Yang Z., Yin B., Zhang J., Gu J., Yin W., Li J., Zhao G., Shi, Z. "A novel rhodamine-based fluorescent and colorimetric "off-on" chemosensor and investigation of the recognizing behavior towards Fe^{3+} ". *Dyes and Pigments* 92, 1337-1343 (2012).
- Shilimkar** T.N. y Anuse M.A. "Rapid extraction of lead(II) from succinate media with n-octylaniline in toluene". *Separation and Purification Technology* 26, 185-193 (2002).

- Shuto** R. "Itai-Itai". *Encyclopedia of toxicology (Second Edition)*, 655-656 (2005).
- Shyam** K., Cosby L. A., Sartorelli A. C. "Synthesis and evaluation of N,N'-bis(arylsulfonyl)hydrazines as antineoplastic agents". *Journal of Medicinal Chemistry* 28, 525-527 (1985).
- Sierra** A.J. "Influencia de las obras de dragado sobre el medio marino". *Ingeniería Civil* 66, 148-158 (1993).
- Singh** N., Kaur N., Mulrooney R.C., Callan J.F. "A ratiometric fluorescent probe for magnesium employing excited state intramolecular proton transfer". *Tetrahedron Letters* 49, 6690-6692 (2008).
- Singh** N. y Jang D.O. "Selective and efficient tripodal receptors for competitive solvent extraction and bulk liquid membrane transport of Hg^{2+} ". *Journal of Hazardous Materials* 168, 727-731 (2009a).
- Singh** N., Mulrooney R.C., Kaur N., Callan J.F. "Fluorescent recognition of potassium and calcium ions using functionalised CdSe/ZnS quantum dots". *Journal of Fluorescence* 19, 777-782 (2009b).
- Singh** N., Kaur N., Dunn J., MacKay M., Callan J.F. "A new fluorescent chemosensor for iron(III) based on the β -aminobisulfonate receptor". *Tetrahedron Letters* 50, 953-956 (2009c).
- Singh** R., Mehta R., Kumar V. "Simultaneous removal of copper, nickel and zinc metal ions using bulk liquid membrane system". *Desalination* 272, 170-173 (2011).
- Singhal** R.K., Preetha J., Karpe R., Tirumalesh K., Kumar S.C., Hegde A.G. "The use of ultra filtration in trace metal speciation studies in sea water". *Environment International* 32, 224-228 (2006).
- Skoog** D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R. "Fundamentos de Química Analítica" (Octava Edición). Ed. Thomson (Madrid) (2005).
- Slaveykova** V.I., Parthasarathy N., Buffle J., Wilkinson K.J. "Permeation liquid membrane as a tool for monitoring bioavailable Pb in natural waters". *Science of the Total Environment* 328, 55-68 (2004).
- Soko** L., Chimuka L., Cukrowska E., Pole S. "Extraction and preconcentration of manganese(II) from biological fluids (water, milk and blood serum) using supported liquid membrane and membrane probe methods". *Analytica Chimica Acta* 485, 25-35 (2003).
- Soller** J.A., Schoen M.E., Bartrand T., Ravenscroft J.E., Ashbolt N.J. "Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non-human sources of faecal contamination". *Water Research* 44, 4674-4691 (2010).
- Soltan** M.E., Moalla S.M.N., Rashed M.N., Fawzy E.M. "Physicochemical characteristics and distribution of some metals in the ecosystem of Lake Nasser, Egypt". *Toxicological and Environmental Chemistry* 87, 167-197 (2005).
- Somogyi** A. "Chapter 6 - Mass spectrometry instrumentation and techniques". *Medical Applications of Mass Spectrometry* 93-140 (2008).

- Song** Y., Ji J., Yang Z., Yuan X., Mao C., Frost R.L., Ayoko G.A. "Geochemical behavior assessment and apportionment of heavy metal contaminants in the bottom sediments of lower reach of Changjiang River". *Catena* 85, 73-81 (2011).
- Sousa** L.R. y Larson J.M. "Crown ether model systems for the study of photoexcited state response to geometrically oriented perturbers. The effect of alkali metal ions on emission from naphthalene derivatives". *Journal of the American Chemical Society* 99, 307-310 (1977).
- Soylak** M. "Solid phase extraction of Cu(II), Pb(II), Fe(III), Co(II), and Cr(III) on Chelex-100 column prior to their flame atomic absorption spectrometric determinations". *Analytical Letters* 37, 1203-1217 (2004).
- Spreti** N., Brinchi L., Germani R., Mancini M.V., Savelli G. "A New Carrier for Selective Removal of Heavy Metal Ions from Aqueous Solutions through Bulk Liquid Membranes". *European Journal of Organic Chemistry* 18, 3865-3871 (2004).
- Sprovieri** M., Feo M.L., Prevedello L., Manta D.S., Sammartino S., Tamburrino S., Marsella E. "Heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in surface sediments of the Naples harbour (Southern Italy)". *Chemosphere* 67, 998-1009 (2007).
- Srinivasan** B.R., Raghavaiah P., Nadkarni V.S. "Reinvestigation of growth of urea thiosemicarbazone monohydrate crystal". *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 112, 84-89 (2013).
- Stanojkovic** T.P., Kovala-Demertzi D., Primikyri A., Garcia-Santos I., Castineiras A., Juranic Z., Demertzis M.A. "Zinc(II) complexes of 2-acetyl pyridine 1-(4-fluorophenyl)-piperazinyl thiosemicarbazone: Synthesis, spectroscopic study and crystal structures - Potential anticancer drugs". *Journal of Inorganic Biochemistry* 104, 467-476 (2010).
- Stylianou** M.A., Hadjiconstantinou M.P., Inglezakis V.J., Moustakas K.G., Loizidou M.D. "Use of natural clinoptilolite for the removal of lead, copper and zinc in fixed bed column". *Journal of Hazardous Materials* 143, 575-581 (2007).
- Sun** W., Yin K., Yu X. "Effect of natural aquatic colloids on Cu(II) and Pb(II) adsorption by Al₂O₃ nanoparticles". *Chemical Engineering Journal* 225, 464-473 (2013).
- Sundaray** S.K., Nayak B.B., Lin S., Bhatta D. "Geochemical speciation and risk assessment of heavy metals in the river estuarine sediments-A case study: Mahanadi basin, India". *Journal of Hazardous Materials* 186, 1837-1846 (2011).
- Suresh** G., Ramasamy V., Meenakshisundaram V., Venkatachalapathy R., Ponnusamy V. "Influence of mineralogical and heavy metal composition on natural radionuclide concentrations in the river sediments". *Applied Radiation and Isotopes* 69, 1466-1474 (2011).
- Suresh-Kumar** H.M., Kunabenchi R.S., Biradar J.S., Math N.N., Kadadevarmath J.S., Inamdar S.R. "Analysis of fluorescence quenching of new indole derivative by aniline using Stern-Volmer plots". *Journal of Luminescence* 116, 35-42 (2006).
- Surucu** A., Eyupoglu V., Tutkun O. "Selective separation of cobalt and nickel by flat sheet supported liquid membrane using Alamine 300 as carrier". *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 18, 629-634 (2012).

- Sutherland** R.A. "BCR[®]-701: A review of 10-years of sequential extraction analyses". *Analytica Chimica Acta* 680, 10-20 (2010).
- Suvarapu** L.N., Seo Y.K., Baek S.O., Ammireddy V.R. "Review on Analytical and Biological applications of Hydrazones and their Metal Complexes". *E-Journal of Chemistry* 9, 1288-1304 (2012).
- Swain** B., Jeong J., Yoo K., Lee J.-c. "Synergistic separation of Co(II)/Li(I) for the recycling of LIB industry wastes by supported liquid membrane using Cyanex 272 and DR-8R". *Hydrometallurgy* 101, 20-27 (2010).
- Tait** R.V. y Dipper F.A. "Chapter 4 - The seawater habitat-physical and chemical conditions". *Elements of Marine Ecology (Fourth Edition)*, 96-165 (1998).
- Takata** H., Aono T., Uchida S. "Distributions of trace metals Co, Cu and Cd in northern Sagami Bay, Japan and their relationship to estuarine variables". *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 111, 84-94 (2012).
- Tam** N.F.Y. y Wong Y.S. "Spatial variation of heavy metals in surface sediments of Hong Kong mangrove swamps". *Environmental Pollution* 110, 195-205 (2000).
- Tang** D., Warnken K.W., Santschi P.H. "Distribution and partitioning of trace metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) in Galveston Bay waters". *Marine Chemistry* 78, Pages 29-45 (2002).
- Tang** L., Zhou P., Zhang Q., Huang Z., Zhao J., Cai M. "A simple quinoline derivatized thiosemicarbazone as a colorimetric and fluorescent sensor for relay recognition of Cu²⁺ and sulfide in aqueous solution". *Inorganic Chemistry Communications* 36, 100-104 (2013).
- Tao** Y.F., Qiu Y., Fang S.Y., Liu Z.Y., Wang Y., Zhu J.H. "Trapping the lead ion in multi-components aqueous solution by natural clinoptilolite". *Journal of Hazardous Materials* 180, 282-288 (2010).
- Tareq** S.M., Maruo M., Ohta K. "Characteristics and role of groundwater dissolved organic matter on arsenic mobilization and poisoning in Bangladesh". *Physics and Chemistry of the Earth* 58-60, 77-84 (2013).
- Templeton** D.M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L.G., Muntau H., Van Leeuwen H.P., Lobinski A.R. "Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendation 2000)". *Pure and Applied Chemistry* 72, 1453-1470 (2000).
- Tercier-Waeber** M.L. y Taillefert M. "Remote in situ voltametric techniques to characterize the biogeochemical cycling of trace metals in aquatic systems". *Journal of Environmental Monitoring* 10, 30-50 (2008).
- Tessier** A., Campbell P.G.C., Bisson M. "Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals". *Analytical Chemistry* 51, 844-851 (1979).
- Tewari** P.K. y Singh A.K. "Preconcentration of lead with Amberlite XAD-2 and Amberlite XAD-7 based chelating resins for its determination by flame atomic absorption spectrometry". *Talanta* 56, 735-744 (2002).

- The Cuong** D. y Obbard J.P. "Metal speciation in coastal marine sediments from Singapore using a modified BCR-sequential extraction procedure". *Applied Geochemistry* 21, 1335-1346 (**2006**).
- Themelis** D.G., Kika F.S., Economou A. "Flow injection direct spectrophotometric assay for the speciation of trace chromium(III) and chromium(VI) using chromotropic acid as chromogenic reagent". *Talanta* 69, 615-620 (**2006**).
- Timerbaev** A.R. "Element speciation analysis using capillary electrophoresis: Twenty years of development and applications". *Chemical Reviews* 113, 778-812 (**2013a**).
- Timerbaev** A.R. y Timerbaev R.M. "Recent progress of capillary electrophoresis in studying the speciation of actinides". *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 51, 44-50 (**2013b**).
- Tokalioglu** S., Yilmaz V., Kartal S., Delibaş A., Soykan C. "Synthesis of a novel chelating resin and its use for selective separation and preconcentration of some trace metals in water samples". *Journal of Hazardous Materials* 169, 593-598 (**2009**).
- Tornero** V., Arias A.M., Blasco J. "Following the Aznalcóllar toxic spill". *Environmental Research* 111, 1033-1036 (**2011**).
- Town** R.M. y Filella M. "A comprehensive systematic compilation of complexation parameters reported for trace metals in natural waters". *Aquatic Sciences* 62, 252-295 (**2000**).
- Trefry** J.H., Trocine R.P., Cooper L.W., Dunton K.H. "Trace metals and organic carbon in sediments of the northeastern Chukchi Sea". *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* (Article in Press) (**2013**).
- Triverdi** P. y Axe L. "Modelling Cd and Zn sorption to hydrous metal oxides". *Environmental Science and Technology* 34, 2215-2223 (**2000**).
- Turan** M., Mart U., Yüksel B., Çelik M.S. "Lead removal in fixed-bed columns by zeolite and sepiolite". *Chemosphere* 60, 1487-1492 (**2005**).
- Turan** S., Tokaliolu Ş., Şahan A., Soykan C. "Synthesis, characterization and application of a chelating resin for solid phase extraction of some trace metal ions from water, sediment and tea samples". *Reactive and Functional Polymers* 72, 722-728 (**2012**).
- Turekian** K.K. y Wedepohl K.H. "Distribution of the elements in some major units of the earth's crust". *Geological Society of America Bulletin* 72, 175-192 (**1961**).
- Turner** A. y Furniss O. "An evaluation of the toxicity and bioaccumulation of thallium in the coastal marine environment using the macroalga, *Ulva lactuca*". *Marine Pollution Bulletin* 64, 2720-2724 (**2012**).
- Uheida** A., Zhang Y., Muhammed M. "Transport of palladium(II) through hollow fiber supported liquid membrane facilitated by nonylthiourea". *Journal of Membrane Science* 241, 289-295 (**2004**).
- Ure** A.M. y Davidson C.M. "Chemical Speciation in the environment" (Second Edition). Ed. Blackwell Science, Oxford (UK) (**2002**).
- USEPA** (United States Environmental Protection Agency). "National Recommended Water Quality Criteria". EPA-822-r-02-047, Office of Science and Technology (**2002**).

- Usero J.**, González-Regalado E., Gracia I. "Trace metals in the bivalve mollusc chamelea gallina from the Atlantic Coast of Southern Spain". *Marine Pollution Bulletin* 32, 305-310 (**1996**).
- Usero J.**, González-Regalado E., Gracia I. "Trace metals in the bivalve molluscs Ruditapes decussatus and Ruditapes philippinarum from the Atlantic coast southern Spain". *Environment International* 23, 291-298 (**1997**).
- Usero J.**, Morillo J., Gracia I. "Heavy metal concentrations in molluscs from the Atlantic coast of southern Spain". *Chemosphere* 59, 1175-1181 (**2005**).
- Uzawa A.**, Narukawa T., Okutani T. "Determination of trace amounts of copper and lead by tungsten metal furnace atomic absorption spectrometry after preconcentration with activated carbon impregnated with 1,2-cyclohexanediondioxime". *Analytical Sciences* 14, 395-398 (**1998**).
- Valcárcel M.** y Silva M. "Teoría y práctica de la extracción líquido-líquido", Ed. Alambra (Madrid) (**1984**).
- Valcárcel M.** y Gómez A. "Técnicas Analíticas de Separación", Ed. Reverté (Barcelona) (**1990**).
- Valenzuela F.**, Fonseca C., Basualto C., Correa O., Tapia C., Sapag J. "Removal of copper ions from a waste mine water by a liquid emulsion membrane method". *Minerals Engineering* 18, 33-40 (**2005a**).
- Valenzuela F.**, Cabrera J., Basualto C., Sapag-Hagar J. "Kinetics of copper removal from acidic mine drainage by a liquid emulsion membrane". *Minerals Engineering* 18, 1224-1232 (**2005b**).
- Valenzuela F.**, Araneda C., Vargas F., Basualto C., Sapag J. "Liquid membrane emulsion process for recovering the copper content of a mine drainage". *Chemical Engineering Research and Design* 87, 102-108 (**2009**).
- Valeur B.** y Leray I. "Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition". *Coordination Chemistry Reviews* 205, 3-40 (**2000**).
- Valeur B.** "Molecular Fluorescence. Principles and Applications". Ed. Wiley-VCH, Weinheim (Alemania) (**2002**).
- Valledor de Lozoya A.** "Envenenamientos por animales: animales venenosos y urticantes del mundo". Ed. Díaz de Santos (Madrid) (**1994**).
- Valtueña J.A.** "Enciclopedia de la ecología y la salud". Ed. Safeliz (Madrid) (**2002**).
- van den Berg C.M.G.** "Determination of copper, cadmium and lead in seawater by cathodic stripping voltammetry of complexes with 8-hydroxyquinoline". *Journal of Electroanalytical Chemistry* 215, 111-121 (**1986**).
- van Gestel C.** y van Brummelen T.C. "Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for the redefinition of terms". *Ecotoxicology* 5, 217-225 (**1996**).
- van Loon G.W.** y Duffy S.J. "Environmental Chemistry: a global perspective". Oxford University Press, New York (United States of America) (**2011**).

- Varol** M. "Assessment of heavy metal contamination in sediments of the Tigris River (Turkey) using pollution indices and multivariate statistical techniques". *Journal of Hazardous Materials* 195, 355-364 (2011).
- Varol** M. y Şen B. "Assessment of nutrient and heavy metal contamination in surface water and sediments of the upper Tigris River, Turkey". *Catena* 92, 1-10 (2012).
- Vasconcelos** M.T.S.D., Leal M.F.C., Van der Berg C.M.G. "Influence of the nature of the exudates released by different marine algae on the growth, trace metal uptake and exudation of *Emiliania huxleyi* in natural seawater". *Marine Chemistry* 77, 187-210 (2002).
- Vega** F.A. y Weng L. "Speciation of heavy metals in River Rhine". *Water Research* 47, 363-372 (2013).
- Verdú-Baeza** J. "Gibraltar: Controversia y Medio Ambiente". Editorial Dykinson (Madrid) (2008).
- Vernekar** P.V., Jagdale Y.D., Patwardhan A.W., Patwardhan A.V., Ansari S.A., Mohapatra P.K., Manchanda V.K. "Transport of cobalt(II) through a hollow fiber supported liquid membrane containing di-(2-ethylhexyl) phosphoric acid (D2EHPA) as the carrier". *Chemical Engineering Research and Design* 91, 141-157 (2013).
- Vicente-Martorell** J.J., Galindo-Riaño M.D., García-Vargas M., Granado-Castro M.D. "Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary". *Journal of Hazardous Materials* 162, 823-836 (2009).
- Vicente-Martorell** J.J. "Biodisponibilidad de metales pesados en dos ecosistemas acuáticos de la costa suratlántica andaluza afectados por contaminación difusa". *Tesis Doctoral*. Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica (2010).
- Vieira** M.A., Grinberg P., Bobeda C.R.R., Reyes M.N.M., Campos R.C. "Non-chromatographic atomic spectrometric methods in speciation analysis: A review". *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 64, 459-476 (2009).
- Vink** J.P.M. "The origin of speciation: Trace metal kinetics over natural water/sediment interfaces and the consequences for bioaccumulation". *Environmental Pollution* 157, 519-527 (2009).
- Waite** T.D. "Chapter 5: "Mathematical modelling of trace element speciation"; en: "Trace element speciation: analytical methods and problems". Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida (United States of America) (1989).
- Walcourt** A., Kurantsin-Mills J., Kwagyan J., Adenuga B.B., Kalinowski D.S., Lovejoy D.B., Lane D.J.R., Richardson D.R. "Anti-plasmodial activity of aroylhydrazone and thiosemicarbazone iron chelators: Effect on erythrocyte membrane integrity, parasite development and the intracellular labile iron pool". *Journal of Inorganic Biochemistry* 129, 43-51 (2013).
- Wang** J., Lu J. y Yarnitzky, C. "Highly sensitive and selective measurements of lead by stripping voltammetry/potentiometry following adsorptive accumulation of the lead-o-cresolphthalexon complex". *Analytica Chimica Acta* 280, 61-67 (1993).
- Wang** Z.-L. y Liu C.-Q. "Distribution and partition behavior of heavy metals between dissolved and acid-soluble fractions along a salinity gradient in the Changjiang Estuary, eastern China". *Chemical Geology* 202, 383-396 (2003).

- Wang** Q., Kim D., Dionysiou D.D., Sorial G.A., Timberlake D. "Sources and remediation for mercury contamination in aquatic systems - A literature review". *Environmental Pollution* 131, 323-336 (2004).
- Wang** D.-D., Li F., Yan X.-P. "On-line hyphenation of flow injection, miniaturized capillary electrophoresis and atomic fluorescence spectrometry for high-throughput speciation analysis". *Journal of Chromatography A* 1117, 246-249 (2006a).
- Wang** Z., Jing M., Lee F.S.C., Wang X. "Synthesis of 8-hydroxyquinoline Bonded Silica (SHQ) and Its Application in Flow Injection-inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Analysis of Trace Metals in Seawater". *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 34, 459-462 (2006b).
- Wang** S., Jia Y., Wang S., Wang X., Wang H., Zhao Z., Liu B. "Fractionation of heavy metals in shallow marine sediments from Jinzhou Bay, China". *Journal of Environmental Sciences* 22, 23-31 (2010a).
- Wang** X., Li B., Ma Y., Hua L. "Development of a biotic ligand model for acute zinc toxicity to barley root elongation". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1272-1278 (2010b).
- Wang** P., Anderko A., Springer R.D., Kosinski J.J., Lencka M.M. "Modeling chemical and phase equilibria in geochemical systems using a speciation-based model". *Journal of Geochemical Exploration* 106, 219-225 (2010c).
- Wang** X.M., Yan H., Feng X.L., Chen Y. "1-Pyrenecarboxaldehyde thiosemicarbazone: A novel fluorescent molecular sensor towards mercury(II) ion". *Chinese Chemical Letters* 21, 1124-1128 (2010d).
- Wang** S. y Peng, Y. "Natural zeolites as effective adsorbents in water and wastewater treatment". *Chemical Engineering Journal* 156, 11-24 (2010e).
- Wang** H., Wang D., Wang Q., Li X., Schalley C.A. "Nickel(II) and iron(III) selective off-on-type fluorescence probes based on perylene tetracarboxylic diimide". *Organic and Biomolecular Chemistry* 8, 1017-1026 (2010f).
- Wang** H., Li Y., Xu S., Li Y., Zhou C., Fei X., Sun L., Zhang C., Li Y., Yang Q., Xu X. "Rhodamine-based highly sensitive colorimetric off-on fluorescent chemosensor for Hg^{2+} in aqueous solution and for live cell imaging". *Organic and Biomolecular Chemistry* 9, 2850-2855 (2011a).
- Wang** Y., Hu X., Wang L., Shang Z., Chao J., Jin W. "A new acridine derivative as a highly selective 'off-on' fluorescence chemosensor for Cd^{2+} in aqueous media". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 156, 126-131 (2011b).
- Wang** C., Liu S., Zhao Q., Deng L., Dong S. "Spatial variation and contamination assessment of heavy metals in sediments in the Manwan Reservoir, Lancang River". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 82, 32-39 (2012a).
- Wang** P., Li Z., Lv G.-C., Zhou H.-P., Hou C., Sun W.-Y., Tian Y.-P. "Zinc(II) complex with teirpyridine derivative ligand as "on-off" type fluorescent probe for cobalt(II) and nickel(II) ions". *Inorganic Chemistry Communications* 18, 87-91 (2012b).

- Wang** Y., Wu H.-Q., Sun J.-H., Liu X.-Y., Luo J., Chen M.-Q. "A novel chemosensor based on rhodamine derivative for colorimetric and fluorometric detection of Cu^{2+} in aqueous solution". *Journal of Fluorescence* 22, 799-805 (2012c).
- Wang** J., Long L., Xie D., Song X. " Cu^{2+} -selective "off-On" chemosensor based on the rhodamine derivative bearing 8-hydroxyquinoline moiety and its application in live cell imaging". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 177, 27-33 (2013a).
- Wang** L., Li H., Cao D. "A new photoresponsive coumarin-derived Schiff base: Chemosensor selectively for Al^{3+} and Fe^{3+} and fluorescence "turn-on" under room light". *Sensors and Actuators B: Chemical* 181, 749-755 (2013b).
- Wang** X., Zhao J., Guo C., Pei M., Zhang G. "Simple hydrazide-based fluorescent sensors for highly sensitive and selective optical signaling of Cu^{2+} and Hg^{2+} in aqueous solution". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 193, 157-165 (2014a).
- Wang** J., Zhang D., Liu Y., Ding P., Wang C., Ye Y., Zhao Y. "A N-stabilization rhodamine-based fluorescent chemosensor for Fe^{3+} in aqueous solution and its application in bioimaging". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 191, 344-350 (2014b).
- Wasserman** J.C., Barros S.R., Lima G.B.A. "Planning dredging services in contaminated sediments for balanced environmental and investment costs". *Journal of Environmental Management* 121, 48-56 (2013).
- Webster** J.R. y Valett H.M. "Chapter 8 – Solute Dynamics". *Methods in Stream Ecology (Second Edition)*, 169-185 (2007).
- Wedepohl** K.H. "The composition of the continental crust". *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59, 1217-1232 (1995).
- Weerasinghe** A.J., Schmiesing C., Sinn E. "Highly sensitive and selective reversible sensor for the detection of Cr^{3+} ". *Tetrahedron Letters* 50, 6407-6410 (2009).
- Wei** T.-B., Zhang P., Shi B.-B., Chen P., Lin Q., Liu J., Zhang Y.-M. "A highly selective chemosensor for colorimetric detection of Fe^{3+} and fluorescence turn-on response of Zn^{2+} ". *Dyes and Pigments* 97, 297-302 (2013).
- Wilson** I.D. "Chapter 5 - Chromatographic and Electrophoretic Separations Combined with Mass Spectrometry for Metabonomics". *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics* (2007).
- Winkler** D. "Collembolan response to red mud pollution in Western Hungary". *Applied Soil Ecology* (Article in Press) (2013).
- Wojciechowski** M. y Balcerzak J. "Square-wave anodic stripping voltammetry of lead and cadmium at cylindrical graphite fiber microelectrodes with in situ plated mercury films". *Analytica Chimica Acta* 249, 433-445 (1991).
- Wojciechowski** K., Kucharek M., Buffle J. "Mechanism of Cu(II) transport through permeation liquid membranes using azacrown ether and fatty acid as carrier". *Journal of Membrane Science* 314, 152-162 (2008).

- Woods** A.M., Lloyd J.M., Zong Y., Brodie C.R. "Spatial mapping of Pearl River Estuary surface sediment geochemistry: Influence of data analysis on environmental interpretation". *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 115, 218-233 (**2012**).
- Wu** Q. y Batley G.E. "Determination of sub-nanomolar concentrations of lead in sea water by adsorptive stripping voltammetry with xylenol orange". *Analytica Chimica Acta* 309, 95-101 (**1995**).
- Wuilloud** J.C.A., Wuilloud R.G., Vonderheide A.P., Caruso J.A.. "Gas chromatography/plasma spectrometry - An important analytical tool for elemental speciation studies". *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 59, 755-792 (**2004**).
- Xie** P., Guo F., Xiao Y., Jin Q., Yao D., Huang Z. "A fluorescent chemosensor based on rhodamine for Cr^{3+} in red spectral region in aqueous solutions and living cells". *Journal of Luminescence* 140, 45-50 (**2013**).
- Xu** S., Li W., Chen K.-C. "Naphthalimide as highly selective fluorescent sensor for Ag^+ ions". *Chinese Journal of Chemistry* 25, 778-783 (**2007**).
- Xu** X., Li Y., Wang Y., Wang Y. "Assessment of toxic interactions of heavy metals in multi-component mixtures using sea urchin embryo-larval bioassay". *Toxicology in Vitro* 25, 294-300 (**2011a**).
- Xu** Z., Zhang L., Guo R., Xiang T., Wu C., Zheng Z., Yang F. "A highly sensitive and selective colorimetric and off-on fluorescent chemosensor for Cu^{2+} based on rhodamine B derivative". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 156, 546-552 (**2011b**).
- Xu** W., Wang X., Cai Z. "Analytical chemistry of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: A review". *Analytica Chimica Acta* 790, 1-13 (**2013a**).
- Xu** H., Wang X., Zhang C., Wu Y., Liu Z. "Coumarin-hydrazone based high selective fluorescence sensor for copper(II) detection in aqueous solution". *Inorganic Chemistry Communications* 34, 8-11 (**2013b**).
- Yafian** M.R., Zamani A.A., Rostamnia S. "Thorium(IV) ion-selective transport through a bulk liquid membrane containing 2-thenoyltrifluoroacetone as extractant-carrier". *Separation and Purification Technology* 49, 71-75 (**2006**).
- Yahya** N. "Carbon and Oxide Nanostructures: Synthesis, Characterisation and Applications (Advanced Structured Materials)". Springer (**2011**).
- Yan** F., Cao D., Yang N., Yu Q., Wang M., Chen L. "A selective turn-on fluorescent chemosensor based on rhodamine for Hg^{2+} and its application in live cell imaging". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 162, 313-320 (**2012**).
- Yan** Z., Wang S., Wang H., Wu S. "Bismuth(III) PVC membrane ion selective electrodes based on two compounds: Acylhydrazones and thiosemicarbazones with 1,3,4-thiadiazole". *Materials Science and Engineering C* 33, 2562-2568 (**2013**).
- Yang** Y., Cheng T., Zhu W., Xu Y., Qian X. "Highly selective and sensitive near-infrared fluorescent sensors for cadmium in aqueous solution". *Organic Letters* 13, 264-267 (**2011**).

- Yang** Y., Chen F., Zhang L., Liu J., Wu S., Kang M. "Comprehensive assessment of heavy metal contamination in sediment of the Pearl River Estuary and adjacent shelf". *Marine Pollution Bulletin* 64, 1947-1955 (2012).
- Yang** L., Zhu W., Fang M., Zhang Q., Li C. "A new carbazole-based Schiff-base as fluorescent chemosensor for selective detection of Fe^{3+} and Cu^{2+} ". *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 109, 186-192 (2013).
- Yi** C., Tian W., Song B., Zheng Y., Qi Z., Qi Q., Sun Y. "A new turn-off fluorescent chemosensor for iron(III) based on new diphenylfluorenes with phosphonic acid". *Journal of Luminescence* 141, 15-22 (2013).
- Yilmaz** A., Kaya A., Alpoguz H.K., Ersoz M., Yilmaz M. "Kinetic analysis of chromium(VI) ions transport through a bulk liquid membrane containing p-tert-butylcalix[4]arene dioxaocetylamine derivative". *Separation and Purification Technology* 59, 1-8 (2008).
- Yokoi** K., Yamaguchi A., Mizumachi M., Koide T. "Direct determination of trace concentrations of lead in fresh water samples by adsorptive cathodic stripping voltammetry of a lead-Calcein Blue complex". *Analytica Chimica Acta* 316, 363-369 (1995).
- Yoo** J.-C., Lee C.-D., Yang J.-S., Baek K. "Extraction characteristics of heavy metals from marine sediments". *Chemical Engineering Journal* 228, 688-699 (2013).
- Yorifuji** T., Kashima S., Tsuda T., Harada M. "What has methylmercury in umbilical cords told us? - Minamata disease". *Science of the Total Environment* 408, 272-276 (2009).
- Yu** C., Zhang J., Wang R., Chen L. "Highly sensitive and selective colorimetric and off-on fluorescent probe for Cu^{2+} based on rhodamine derivative". *Organic and Biomolecular Chemistry* 8, 5277-5279 (2010).
- Yuan** H., Song J., Li X., Li N., Duan L. "Distribution and contamination of heavy metals in surface sediments of the South Yellow Sea". *Marine Pollution Bulletin* 64, 2151-2159 (2012).
- Yunus** M., Sohel N., Hore S.K., Rahman M. "Arsenic exposure and adverse health effects: A review of recent findings from arsenic and health studies in Matlab, Bangladesh". *Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 27, 371-376 (2011).
- Zamani** H.A., Hamed-Mosavian M.T., Aminzadeh E., Ganjali M.R., Ghaemy M., Behmadi H., Faridbod F. "Construction of barium(II) PVC membrane electrochemical sensor based on 3-deoxy-d-erythro-hexos-2-ulose bis (thiosemicarbazone) as a novel ionophore". *Desalination* 250, 56-61 (2010).
- Zawierucha** I., Kozłowski C., Malina G. "Removal of toxic metal ions from landfill leachate by complementary sorption and transport across polymer inclusion membranes". *Waste Management* 33, 2129-2136 (2013).
- Zen** J.-M. y Ting Y.-S. "Square-wave voltammetric stripping analysis of lead(II) at a Nafion[®]/copper-mercury film electrode". *Analytica Chimica Acta* 332, 59-65 (1996).
- Zhang** B. y Gozzelino G. "Facilitated transport of Fe(III) and Cu(II) ions through supported liquid membranes". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 215, 67-76 (2003).

- Zhang W.**, Liu J., Ren Z., Wang S., Du C., Ma J. "Kinetic study of chromium(VI) facilitated transport through a bulk liquid membrane using tri-n-butyl phosphate as carrier". *Chemical Engineering Journal* 150, 83-89 (2009).
- Zhang W.**, Cui C., Hao Z. "Transport study of Cu(II) through hollow fiber supported liquid membrane". *Chinese Journal of Chemical Engineering* 18, 48-54 (2010a).
- Zhang J.F.**, Lim C.S., Cho B.R., Kim J.S. "A two-photon excited luminescence of water-soluble rhodamine-platinum(II) complex: Fluorescent probe specific for Hg^{2+} detection in live cell". *Talanta* 83, 658-662 (2010b).
- Zhang C.**, Qiao Q., Piper J.D.A., Huang B. "Assessment of heavy metal pollution from a Fe-smelting plant in urban river sediments using environmental magnetic and geochemical methods". *Environmental Pollution* 159, 3057-3070 (2011).
- Zhang W.**, Liu X., Cheng H., Zeng E.Y., Hu Y. "Heavy metal pollution in sediments of a typical mariculture zone in South China". *Marine Pollution Bulletin* 64, 712-720 (2012).
- Zhang R.**, Zhou L., Zhang F., Ding Y., Gao J., Chen J., Yan H., Shao W. "Heavy metal pollution and assessment in the tidal flat sediments of Haizhou Bay, China". *Marine Pollution Bulletin* 74, 403-412 (2013a).
- Zhang J.**, Zhou Y., Hu W., Zhang L., Huang Q., Ma T. "Highly selective fluorescence enhancement chemosensor for Hg^{2+} based on rhodamine and its application in living cells and aqueous media". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 183, 290-296 (2013b).
- Zhang D.**, Li M., Wang M., Wang J., Yang X., Ye Y., Zhao Y. "A rhodamine-phosphonate off-on fluorescent sensor for Hg^{2+} in natural water and its application in live cell imaging". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 177, 997-1002 (2013c).
- Zhang G.**, Bi S., Song L., Wang F., Yu J., Wang L. "New diketopyrrolopyrrole (DPP) derivative as fluorescent probe for Zn^{2+} ". *Dyes and Pigments* 99, 779-786 (2013d).
- Zhang J.X.J.** y Hoshino K. "Chapter 1 - Introduction to Molecular Sensors"; en: "Molecular Sensors and Nanodevices. Principles, Designs and Applications in Biomedical Engineering". Elsevier (UK), 1-42 (2014a).
- Zhang X.-H.**, Zhao C.-F., Li Y., Liu X.-M., Yu A., Ruan W.-J., Bu X.-H. "Two hexaazatriphenylene based selective off-on fluorescent chemosensors for cadmium(II)". *Talanta* 119, 632-638 (2014b).
- Zhao Y.**, Zhang X.-B., Han Z.-X., Qiao L., Li C.-Y., Jian L.-X., Shen G.-L., Yu R.-Q. "Highly sensitive and selective colorimetric and off-on fluorescent chemosensor for Cu^{2+} in aqueous solution and living cells". *Analytical Chemistry* 81, 7022-7030 (2009).
- Zhao L.**, Fei D., Dang Y., Zhou X., Xiao J. "Studies on the extraction of chromium(III) by emulsion liquid membrane". *Journal of Hazardous Materials* 178, 130-135 (2010).
- Zhao S.**, Feng C., Yang Y., Niu J., Shen Z. "Risk assessment of sedimentary metals in the Yangtze Estuary: New evidence of the relationships between two typical index methods". *Journal of Hazardous Materials* 241-242, 164-172 (2012).

- Zhao S.**, Feng C., Wang D., Liu Y., Shen Z. "Salinity increases the mobility of Cd, Cu, Mn, and Pb in the sediments of Yangtze Estuary: relative role of sediments' properties and metal speciation.". *Chemosphere* 91, 977-984 (**2013a**).
- Zhao Q.**, Chai Y., Yuan R., Luo J. "Square wave anodic stripping voltammetry determination of lead based on the Hg(II) immobilized graphene oxide composite film as an enhanced sensing platform". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 178, 379-384 (**2013b**).
- Zhao M.**, Ma L., Zhang M., Cao W., Yang L., Ma L.-J. "Glutamine-containing "turn-on" fluorescence sensor for the highly sensitive and selective detection of chromium(III) ion in water". *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 116, 460-465 (**2013c**).
- Zheng A.**, Chen J., Wu G., Wu G., Zhang Y.G., Wei H. "A novel fluorescent distinguished probe for Cr(VI) in aqueous solution". *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 74, 265-270 (**2009**).
- Zheng S.**, Wang P., Wang C., Hou J., Qian J. "Distribution of metals in water and suspended particulate matter during the resuspension processes in Taihu Lake sediment, China". *Quaternary International* 286, 94-102 (**2013a**).
- Zheng H.**, Chen J., Wang B., Zhao S. "Recovery of copper ions from wastewater by hollow fiber supported emulsion liquid membrane". *Chinese Journal of Chemical Engineering* 21, 827-834 (**2013b**).
- Zheng J.-L.**, Luo Z., Liu C.-X., Chen Q.-L., Tan X.-Y., Zhu Q.-L., Gong Y. "Differential effects of acute and chronic zinc (Zn) exposure on hepatic lipid deposition and metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*". *Aquatic Toxicology* 132-133, 173-181 (**2013**).
- Zhong H.** y Wang W.-X. "Effects of sediment composition on inorganic mercury partitioning, speciation and bioavailability in oxic surficial sediments". *Environmental Pollution* 151, 222-230 (**2008**).
- Zhou H.Y.**, Cheung R.Y.H., Chan K.M., Wong M.H. "Metal concentrations in sediments and Tilapia collected from inland water of Hong Kong". *Water Research* 32, 3331-3340 (**1998**).
- Zhou Y.**, Xiao Y., Qian X. "A highly selective Cd²⁺ sensor of naphthyridine: fluorescent enhancement and red-shift by the synergistic action of forming binuclear complex". *Tetrahedron Letters* 49, 3380-3384 (**2008**).
- Zhou Y.**, Zhou H., Ma T., Zhang J., Niu J. "A new Schiff base based on vanillin and naphthalimide as a fluorescent probe for Ag⁺ in aqueous solution". *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 88, 56-59 (**2012a**).
- Zhou Q.**, Liu W., Chang L., Chen F. "Spectral study of the interaction between 2-pyridinecarbaldehyde-p-phenyldihydrazone and ferric iron and its analytical application". *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 92, 78-83 (**2012b**).
- Zhou Y.**, Zhang J., Zhang L., Zhang Q., Ma T., Niu J. "A rhodamine-based fluorescent enhancement chemosensor for the detection of Cr³⁺ in aqueous media". *Dyes and Pigments* 97, 148-154 (**2013**).

Zhu X., Fu S., Wong W.-K., Wong W.-Y. "A near-infrared fluorescent chemodosimeter for silver(I) ion based on an expanded porphyrin". *Tetrahedron Letters* 49, 1843-1846 (**2008**).

Zhu X., Wang J.D., Solo-Gabriele H.M., Fleming L.E. "A water quality modeling study of non-point sources at recreational marine beaches". *Water Research* 45, 2985-2995 (**2011**).

Zhu H.-N., Yuan X.-Z., Zeng G.-M., Jiang M., Liang J., Zhang C., Yin J., Huang H.-J., Liu Z.-F., Jiang, H.-W. "Ecological risk assessment of heavy metals in sediments of Xiawan Port based on modified potential ecological risk index". *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)* 22, 1470-1477 (**2012**).

Zwolsman J.J.G. y van Eck G.Th.M. "Geochemistry of major elements and trace metals in suspended matter of the Scheldt estuary, southwest Netherlands ". *Marine Chemistry* 66, 91-111 (**1999**).

English summary

Contents

Objectives

Chapter I: Introduction. Heavy metals in the environment

Chapter II: Development of a liquid membrane for the determination of lead traces in natural waters

Chapter III: Photophysical investigation of two Schiff bases for iron determination in aqueous solution

Chapter IV: Assessment of the metal pollution in Algeciras Bay

Conclusions

References

Objectives

The ability of some heavy metals to produce bioaccumulation and biomagnification processes, combined with their toxicity, make them priority substances in the field of water policy in which are included these elements as well as some of its compounds (Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008).

Urban and industrial human activities have caused over the years the pollution of the river waters, estuaries and coasts as a result of the discharge of various substances, among which heavy metals are highlighted. These elements tend to concentrate in most of aquatic compartments in a particular ecosystem (such as suspended matter, sediments and organisms). Heavy metals can become part of the food chain and, therefore, they are considered as potential pollutants on human health.

Due to the huge concern to achieve a proper quality level for aquatic ecosystems, the EU Water Framework Directive (Directive 2000/60/EC, of the European Parliament and of the Council, of 23 October 2000), which establishes a community framework in the field of the water policy, which regulates the use and protection of waters at European level with the aim of prevent and reduce pollution, promote sustainable water usage, environmental protection, improve the quality of aquatic ecosystems and mitigate the effects of floods and droughts.

One of the main lines of investigation of the research group where this Doctoral Thesis was carried out (Geoquímica Marina, RNM-236 of the Junta de Andalucía) is the development of new methodologies for the determination of heavy metals in environmental samples. The main objectives of the present research work have been approached from two points of view: the development of new methods of analysis that allow to assess subtraces and ultratrace levels of heavy metals and the application of these and other methodologies to the study of metallic pollution of coastal waters, in this case from and Andalusian coastal waters, where most bioavailable chemical forms were evaluated. These species can be associated with environmental toxicity.

In order to achieve these aims, the following specific objectives have been followed:

- *Chapter I* consists of a general introduction about heavy metals and its behaviour in aquatic ecosystems.

In the following two chapters organic ligands (with high chelating properties, characterized by the presence of an imine group) have been applied in the determination of trace metals in aqueous samples.

- In *Chapter II*, a new method for the preconcentration and analysis of lead traces based on the use of a bulk liquid membrane, using the ligand 2-hydroxybenzaldehyde-N-ethylthiosemicarbazone (2-HBET) as carrier agent in the membrane is developed. It should be noted the application of this method to natural samples, especially saline samples.

- Within the *Chapter III*, which was carried out during a research stay at the University of Ulster (Coleraine, UK) under the direction of Professor John D. Callan, two Schiff bases were studied as fluorescent molecular sensors for iron, suggesting these molecules as potential indicators of metal ions for future studies in the field of optical sensors.

- Lastly, in *Chapter IV*, the evaluation of metal content (Zn, Cd, Pb and Cu) in waters affected by intense anthropogenic activities is performed. The selected area is Algeciras Bay, characterized by chronic persistent impact. In its surroundings, there are industries that directly or indirectly usually make use of heavy metals, which are considered as priority pollutants. Therefore, the aim of this study is to assess the level of contamination of some metals in water, sediments and biota. These three environmental compartments are referenced in Water Framework Directive for the monitoring of marine waters. Specifically the following studies are proposed:

- Evaluation of the total levels of metals (Zn, Cd, Pb, and Cu, common metals in industry) present in water and sediments, and study their distribution in different chemical fractions (speciation) in both compartments.
- Quantification of the concentration levels of metals in gills, liver and muscle tissues in fish of commercial interest.
- Identifying the more bioavailable chemical forms and therefore more potentially toxic of the metals studied.

Chapter I

Introduction. Heavy metals in the environment

Water is essential to life and is the defining characteristic of Earth, the blue planet. Hydrology is the study of the global water cycle and the physical, chemical, and biological processes involved in the different reservoirs and fluxes of water within this cycle. Most of the world's water (approximately 96.3%) is in the world's oceans. Glaciers and ice sheets lock up more than half of the remaining water, with 90% of this stored in the Antarctic Ice Sheet. Most of what remains lies below the surface, in groundwater aquifers, where vast reserves of water are saline or difficult to access. Surface water constitutes only 0.02% of the global inventory, distributed between rivers, lakes, wetlands, soils, and the biosphere. Water supplies are mainly allocated to a range of agricultural, municipal, industrial, hydroelectrical, and ecological needs. Some of these water uses are consumptive, removing water from the system; other types of water use return the water to a river, lake, or to the ground, but the water often requires treatment to restore it to a natural state and sometimes this is not possible. While physical hydrologists focus on water quantity and supply, water quality is of fundamental concern for ecological and human health [Manahan, 2010; Marshal, 2013; Odlare, 2014].

Industrial discharges, domestic sewage, land drainage and oil spills are the primary sources of water pollution. Historically, most ports grew up on estuaries and became centres of population and industry. With the growth of population and industry, urban and industrial waste were discharged directly into the estuary without previous

treatment resulting in the contamination of some estuaries. Also, with the aim to conserve rivers and lakes for drinking water supplies, new industry, which requires large volumes of water, has tended to be located on the coast. In the past, untreated municipal waste discharged directly by numerous outfalls, has been another inputs of material to the sea [Clark, 2001; Radojevic and Bashkin, 2006].

Water pollution is the contamination of natural water bodies by chemical, physical, radioactive or pathogenic microbial substances. Contamination is defined as the input of substances which do not normally occur, or at concentrations above natural background, and pollution is a contamination that causes adverse biological effects in the natural environment [Chapman, 2007]. Water is mainly referred to as polluted when it is impaired by anthropogenic contaminants and becomes unable to support a human use, such as drinking water, and/or undergoes a marked shift in its ability to support its constituent biotic communities, such as fish.

Pollutants have been categorized into organic, inorganic, and biological on the basis of their nature and origin [Gupta and Ali, 2013]:

- *Organic* water pollutants mainly include food processing waste, petroleum hydrocarbons (fuels, lubricants, fuel combustion by-products, etc.), disinfection by-products, volatile organic compounds (VOCs), insecticides and herbicides, tree and bush debris from logging operations, chlorinated solvents, perchlorate, polychlorinated biphenyl (PCB) and trichloroethylene. Persistent organic pollutants (POPs) are a class of organic pollutants, resistant to environmental degradation. These are quite stable organic compounds and therefore, easily resist degradation to different environmental stresses. There are a few natural sources of POPs but most POPs are created by humans in industrial processes, either intentionally or as by-products [Xu and col., 2013].

- *Inorganic* chemical pollutants are naturally found in the environment but due to human development, these pollutants are often concentrated and released into the environment in urban storm water. Some of these compounds are: acidity caused by industrial discharges, fertilizers, chemical waste, ammonia, silt or sediments and heavy metals.

- *Biological* contaminants include bacteria, molds, mildew, cat saliva, viruses, animal dander, house dust, mites, cockroaches, and pollen. Such pollutants originate from different sources.

Special interest needs to be given to the group of heavy metals, in which this Doctoral Thesis is focuses. This term refers to any metallic chemical element that has a relatively high density (usually specific density of more than 5 g/cm³) [Berkowitz et al., 532

2008]. There is a tendency, unsupported by the facts, to assume that all so-called "heavy metals" and their compounds have highly toxic or ecotoxic properties. This has no basis in chemical or toxicological data. No relationship can be found between density (specific gravity) and any of the various physicochemical concepts that have been used to define "heavy metals" and the toxicity or ecotoxicity attributed to "heavy metals". With regard to toxicity, differentiation between metals depends upon the chemical properties of the metals and their compounds and upon the biological properties of the organisms at risk. Some authors support there is a need to establish a new classification based on the periodic table [Duffus, 2002].

Metals are not subject to bacterial degradation and so are essentially permanent additions to the sea. Biocentration, bioaccumulation, biomagnification and bioavailability are important terms related to heavy metal behaviour, defined as follows [Markert, 2007; Nordberg, 2009]:

- *Bioconcentration*: Process leading to a higher concentration of a substance in an organism than in environmental media to which it is exposed.
- *Bioaccumulation*: Progressive increase in the amount of a substance in an organism or part of an organism that occurs because the rate of intake from all contributing sources and by all possible routes exceeds the organism's ability to eliminate the substance from its body.
- *Biomagnification*: Result of these processes of bioconcentration and bioaccumulation by which tissue concentrations of bioaccumulated chemicals increase as the chemical passes up through two or more trophic levels.
- *Bioavailability*: Potential for uptake of a substance by a living organism, usually expressed as a fraction of the total amount of the substance available in the matrix of exposure.

In trace amounts, some heavy metals, such as Co, Cu, Ni, Se or Zn, are essential to all organisms to accomplish specific catalytic functions, while some other like As, Cd, Pb, Hg, Cr and Al are key elements due to their extreme toxicity even at low concentrations. For example, in plants, B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni and Zn can act as essential metals. Several of these elements are redoxactive that makes them essential as catalytically active cofactors in enzymes, others have enzyme-activating functions, and yet others fulfill a structural role in stabilizing proteins [Berkowitz et al., 2008; Hänsch and Mendel, 2009; Crichton, 2012]. Although the clinical presentations of toxicoses from the different metals may be quite varied, most metals induce damage

through similar mechanisms, either by binding of the metals to vital enzymes or by substitution of the metals for other elements in biochemical reactions. Differences in clinical disease induced by metals more often reflect differences in absorption, distribution, or metabolism rather than differences in toxic mechanism [Gwaltney-Brant, 2013].

Heavy metals discharged into aquatic system by natural or anthropogenic sources during their transport are distributed between the aqueous phase and sediments. Because of adsorption, hydrolysis and co-precipitation only a small portion of free metal ions stay dissolved in water and a large quantity of them are deposited in the sediment. Hence, sediments of aquatic system have been regarded as an important reservoir or sink for trace metals, and contaminated sediments may have a range of toxicological effects on benthic fauna and associated species. Moreover, heavy metal elements cannot be constantly fixed by sediments, as changed environmental conditions, such as pH, redox potential, salinity, and resuspension, can facilitate some of the sediment-bound metals released back to water columns. Spatial surveys of metal concentrations in the sediments are useful to assess pollution in the marine environment and to provide basic information for the judgment of environmental health risks [Roberts, 2012; Hou et al., 2013; Hu et al., 2013a; Bastami et al., 2014].

In the aquatic environment, metals exist in a chemical equilibrium between free, dissolved ions, organic and inorganic complexes, and metal bound to organic and inorganic particles. Metals are present as various aquo- and mixed aquo complexes with amines, humic, OH^- , CO_3^{2-} , in seawater Cl^- , or bound to organic and inorganic compounds, which may be dissolved or associated to sediment. Interactions of trace metals with natural ligands (which are ubiquitous in freshwater and marine sediments) play an important role in trace metals transport, fate, and bioavailability in natural systems. Depending on hydrodynamics, biogeochemical processes and environmental conditions of ecosystems, metals can change its mobility, bioavailability, toxicity or bioaccumulation [Bjerregaard and Andersen, 2007; Chakraborty, 2012].

Since the availability of heavy metals depends on their chemical form, the determination of total concentrations alone is not sufficient to provide reliable information on their actual behaviour and their biological effects. For this reason, many scientific studies have been aimed at developing analytical speciation methods in order to determine metals mobility and its behaviour in the environment. Changes in the chemical form of heavy metals may influence their stability, solubility, potential bioavailability and toxicity [van Loon and Duffy, 2011; Ianni et al., 2010; Zhang et al., 2012].

Ure and Davidson in 2002 defined the term speciation as either the process of identifying and quantifying the different, defined species forms or phases present in a material, or the description of the amounts and kinds of these species, form or phases present [Ure and Davidson, 2002]. The International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC) has published guidelines or recommendations for the definition of *speciation analysis*, defined as the analytical activity of indentifying and/or measuring the quantities of one or more individual chemical species in a sample. *Chemical species* are specific forms of an element defined as to isotopic composition, electronic or oxidation state and/or complex or molecular structure. Also defines the *speciation of an element* as the distribution of an element amongst defined chemical species in a system. In the case that it is not possible to determine the concentration of different chemical species of an element, it can be a useful practice the *fractionation* process, defined as a classification of an analyte or a group of analytes from a certain sample according to the physical (e.g. size, solubility) or chemical (e.g. bonging, reactivity) properties [Templeton et al., 2000].

Speciation studies are of interest to chemists doing research on the evaluation and chemical treatment of waters, soils, and sediments, to biologists inquiring about the influence of species on animals and plants, and to geochemists investigating the transport of elements in the environment. However, the most important reason for speciation analysis is to identify the metal species that have adverse effects on living organisms. The interaction of metals with biota is highly dependent on their chemical forms, being the impact of some metals strongly related to their oxidation state and/or organic or inorganic structure, rather than to their total concentration [Adamo and Zampella, 2008; González et al., 2009; González et al., 2010].

In conclusion, speciation analysis can be considered as the last frontier in elemental analysis because it implies the determination of very low concentrations of minor species and involves serious difficulties to find selective enough methods. Thus, one of the aims of this work is the development of new analytical methods to quantify heavy metals in environmental samples; while the other objective is to study the distribution of heavy metals in different compartments of aquatic environment in the Algeciras Bay and to assess bioavailability and potential impact on aquatic biota.

Chapter II

Development of a liquid membrane for the determination of lead traces in natural waters

Lead (Pb) is a non-essential trace element considered a highly toxic heavy metal. Exposure to Pb is associated with chronic diseases in the nervous, hematopoietic, skeletal, renal and endocrine systems. Pb has been identified also as a potential risk factor for osteoporosis and osteoarthritis. Most of body Pb burden is stored in skeleton, so bone tissues seem to have the function to keep down the serum levels of Pb due to its capacity to accumulate and store this toxic element [Pemmer et al., 2013].

Pb can occur naturally in soil, water and air. Rivers contain about 0.13-60.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ of total dissolved lead. Estuary, bays and coastal waters contain from about 0.04-7.44 $\mu\text{g L}^{-1}$ and open ocean waters levels are found between 0.000041-9 $\mu\text{g L}^{-1}$. These concentrations depend on numerous factors, mainly anthropogenic inputs in a given area [Crompton, 2007].

Anthropogenic Pb inputs can come from different activities such as lead ore mining and smelting, ferrous and non-ferrous metal manufacturing plants, coal and alkyl-lead petrol burning, waste incineration, production and storage of batteries, leaded glass, lead oxide pigments and ferroalloys, metal fabricating industries. The progressive removal of leaded petrol has resulted in a significant decrease in the global atmospheric lead burden over the last few decades [Álvarez-Iglesias et al., 2012].

The vital importance of trace metal analysis in environmental water samples is widely recognised. In many cases, due to the low levels of trace metals in aquatic samples and the high complexity of the matrixes (i.e. seawater), they must be extracted from original samples and concentrated to suitable levels for analysis techniques. Spectrophotometric methods and flame atomic absorption spectroscopy (FAAS) are low cost and available techniques in many laboratories, but they usually present insufficient sensibility for direct Pb determination in water samples. Furthermore, sample matrix can cause measurement interferences. Consequently, a separation, preconcentration and matrix simplification step prior to lead determination by FAAS is normally necessary.

Most common conventional separation methods used included precipitation reactions, solvent extractions and chromatography. Solvent extraction is an effective way to extract metals with some advantages such as high selectivity, well-established process, sturdiness and favourable economics. Stripping of metals from the loaded organic phase is generally required due to the difficulties that organic solvents produce in atomization step by plasma, furnace or flame. For this reason, membrane separation technology has been an interesting alternative for separation and enrichment processes, since extraction and stripping processes can be carried out simultaneously [Kislik, 2012; Rounaghi et al., 2012; Hu et al., 2014].

In general, a membrane may be regarded as a semipermeable barrier placed between two aqueous phases (feed and stripping phases). Chemical species can move through the membrane from a high-solute concentration region to a lower one by means of a simple diffusion process. Different solutes have different solubilities and diffusion coefficients in a liquid membrane. The efficiency and selectivity of transport across the liquid membrane may be enhanced by the presence of a complexation agent (carrier) in the organic phase. This process is known as facilitated or carrier-mediated liquid membrane separation. In many cases, the facilitated transport is combined with coupling counter or cotransport of other ions through the membrane, supplying the energy for uphill transport of the solute [Kiskik, 2010].

Liquid membrane technologies are being studied extensively by researchers in such fields as analytical, inorganic, organic chemistry, chemical engineering, biotechnology, biomedical engineering and wastewater treatment.

There are several liquid membrane operation techniques and configurations, highlighting bulk, supported and emulsion liquid membrane (BLM, SLM and ELM). The applications of permeation liquid membranes to the analysis of different samples show potential advantages such as high selectivity, reduced sample handling, ease automation and useful in field or in situ analysis. Also, this systems can provide information about free and other chemical forms of metals, being interesting for speciation studies of environmental relevance [Parthasarathy et al., 2003].

Since bulk liquid membranes have simple designs and offer ease of control, these are frequently implemented for laboratory studies [Rounaghi et al., 2012]. In recent literature, BLM configurations have been applied to determinate trace metals in aqueous solutions. Efficient transport of Cr(VI) using tri-n-butyl phosphate (TBP) as carrier was studied and applied to chrome electroplating wastewater with good results [Muthuraman et al., 2009]. In the same way, other authors developed a BLM for the selective transport of Cd(II) and Zn(II) ions from sodium chloride medium using Aliquat 336 dissolved in benzene as liquid membrane. The method was applied for real samples such as leach solutions of zinc purification cake and spent Ni-Cd cells [Dalali et al., 2012]. D2EHPA is an organic reagent extensively applied in liquid membranes for the transport of some metal ions. The separation of Cu(II), Ni(II) and Zn(II) was analysed for BLM using D2EHPA dissolved in kerosene as organic phase. Maximum extraction of 96% of Cu(II), 95% of Ni(II) and 99% of Zn(II) was achieved at the optimum established conditions [Singh et al., 2011].

The transport of metal ions from the feed solution to the stripping one through a bulk liquid membrane can be divided into the following steps [Koter et al., 2013]:

- 1) diffusion of metal ions through the diffusion boundary layer (DBL) from the feed bulk to the membrane surface,
- 2) complexation of metal ions with the carrier at the membrane surface,
- 3) diffusion of the metal-carrier complex through DBL on the membrane side,
- 4) convection transport (stirring of BLM) to the strip side of the membrane,
- 5) diffusion of the complex through DBL on the membrane side,
- 6) decomplexation of the metal ions at the boundary membrane-strip solution,
- 7) diffusion through DBL adjacent to the membrane on the stripping side.

The aim of this work is to investigate the use of the thiosemicarbaonze 2-hydroxybenzaldehyde-N-ethylthiosemicarbazone (2-HBET) (Figure S.1) as carrier in the development of a new bulk liquid membrane for the separation and preconcentration of lead from natural water samples. This kind of compounds can form selective and stable complexes with many metal ions because of the presence of nitrogen, sulphur and oxygen atoms. Therefore, the synthesis and application of new functionalized

compounds for specific applications have been studied [Yan et al., 2013]. Additionally, the ability of thiosemicarbazones to form stable complexes with metal ions makes them versatile compounds and have been explored as antiviral, antifungal, antibacterial and antitumoral agents [Hancock et al., 2011; Aljahdali and El-Sherif, 2013; Qasem Ali et al., 2014].

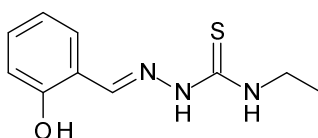


Figure S.1. 2-hydroxybenzaldehyde-N-ethylthiosemicarbazone (2-HBET)

2-HBET has been previously used in our research group as active compound in the organic phase of a bulk liquid membrane for the separation/preconcentration of nickel in seawater [Aouarram et al., 2007] and in copper complexes forms as catalysts for olefin cyclopropanations [Youssef et al., 2012]. This ligand has been applied in this work for the first time as carrier of Pb(II) in a liquid membrane system.

Methodology and previous studies

For the preconcentration/separation of Pb(II) using a bulk liquid membrane configuration, a cylindrical quartz homemade beaker-in-a-beaker type cell (11.34 i.d.) was used (Figure S.2). Feed solution was placed in the outer compartment ($V_F=250$ mL), while the inner compartment was filled with the stripping solution ($V_S=11$ mL). The organic solution containing the carrier dissolved in toluene was placed on the top, covering both aqueous solutions ($V_O=80$ mL). Under these conditions preconcentration factor (PF) was 22.73, provided by the ratio V_F/V_S . During the whole experiment, aqueous solutions were stirred by teflon-coated magnetic bars (12 x 4 mm diameter) using a magnetic stirrer plate (135 mm diameter, Carousel Standard, Radleys, Essex, UK).

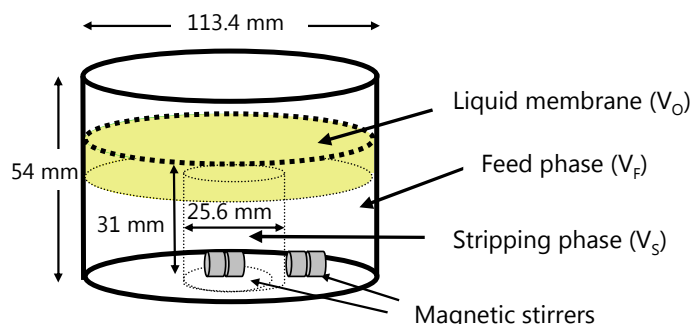


Figure S.2. Cell of bulk liquid membrane (BLM) with a preconcentration factor of 22.73

The usual composition of each phase is described below:

- Feed phase (V_F): This aqueous phase contains the metal ion to be extracted with a certain volume of pH buffer solution. The pH value is critically important for the right reaction between the metal and the carrier to form the neutral complex in the liquid membrane.
- Liquid membrane (V_O): Consists of an organic carrier dissolved in an organic solvent. Since it is lighter than water, this phase will be placed on both aqueous solutions. The optimum volume of organic phase is that, which being minimal, permits total contact with the two aqueous phases and maximises the transport rate.
- Stripping phase (V_S): This phase usually contains an acid that reacts with the neutral metal-ligand complex allowing metal release. The volume of this aqueous phase is far less than the feed one, so the analyte is preconcentrated. This is one of the main aims of this procedure.

In many cases of LM transport, especially with cations or anions selective separations, carrier-facilitated transport is combined with stoichiometrically coupling counter-transport of co-ions in the direction opposite to the solute, or co-transport of ions with the opposite ion charge to the solute in the same solute direction. The coupling effect supplies the energy for uphill transport of the solute [Kislik, 2010]. In this case, the metal ion content in the feed phase solution reacts with the carrier at the membrane surface and forms the complex. This neutral complex is extracted by the organic phase and destroyed by the acid phase, producing the metal transport through the membrane. The pH gradient between feed and stripping solutions is the driving force for this transport, which is shown in Figure S.3. This coupling counter-transport of H^+ enables transport against the metal concentration gradient.

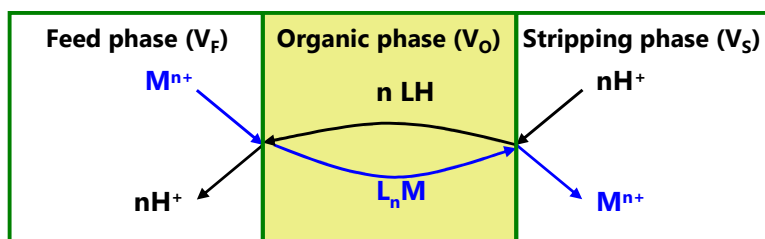


Figure S.3. Schematic description of counter-transport of metal ion in the bulk liquid membrane (M: metal ion; L=carrier)

Several previous studies were carried out in order to select the adequate carrier and the organic solvent. The purpose of the first study was to evaluate the solubility of a range of organic reagents (hydrazones and derivatives) in some organic solvents suitable for its use in the membrane cell configuration described above (hexanol, octanol and toluene). The thiosemicarbazone 2-HBET was chosen among all the reagents tested because of its solubility and interesting properties as metal ion chelating agent. Toluene was the solvent finally selected due to its low solubility in water and dielectric constant.

Once selected the constituents of the liquid membrane (carrier and organic solvent), a study of its capacity to be successfully applied in extraction-reextraction process across a bulk liquid membrane system was carried out. For this purpose, six environmentally significant metal ions were evaluated (Tl(I), Pb(II), V(V), Ti(IV), Ag(I) and Cr(III)). For these experiments, the final composition of each phase was:

- Feed phase (V_F): A total volume of 300 mL of $100 \mu\text{g L}^{-1}$ for Tl(I) and Pb(II) and $50 \mu\text{g L}^{-1}$ for V(V), Ti(IV), Ag(I) and Cr(III) aqueous solution was prepared using Milli-Q deionised water. Acid and basic pH values (4 and 9.5) were tested for previous studies. For acid values, pH was adjusted by addition of HCl and NaOH (Suprapur grade, Merck Alemania). To obtain a pH value of 9.5 in the feed phase, 30 mL of $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ (6 mol L^{-1}) buffer solution were added to the metal solution. 250 mL of this solution were placed in the external compartment of the cell, employing the rest for the measurement of the pH.
- Liquid membrane (V_O): 80 mL of 2-HBET in toluene ($1.42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). To facilitate metal ion transport across the liquid membrane, the carrier was in excess compared to the metal ion content in the feed phase.
- Stripping phase (V_S): 11 mL of nitric acid (HNO_3) (0.3 mol L^{-1})

The results from these studies are shown in Table S.1. Final metal concentration in stripping phase was determined by ICP-AES technique (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy). It can be observed that in most cases the percentage of preconcentration was below the limit of detection (LD) of the technique. Pb(II) was the only metal that showed a substantial preconcentration rate. In every experiment, the system was magnetically stirred at 700 r.p.m. during 4 hours at room temperature. To calculate the percentage of preconcentration the following expression was used:

$$\% \text{ Preconcentration} = \frac{\text{Measured concentration}}{\text{Expected concentration}} \cdot 100;$$

where the *measured concentration* is the concentration obtained by ICP-AES in the stripping phase and the *expected concentration* is the metal concentration in the case of a 100% preconcentration efficiency. For the purpose of the aforementioned calculation, the preconcentration factor and the initial amount of metal in the feed phase are needed.

The limit of detection for every metal ion was calculated by ICP-AES technique using the following expression:

$$LD = 3\sigma_b / b;$$

defined as 3 times the standard deviation of the blank (σ_b), divided by the slope (b) of the calibration curve used for the determination of each metal.

Based on these results, further studies on the proposed bulk liquid membrane system were focused in the development of a new method for the separation/preconcentration of lead (Pb(II)) traces using the carrier 2-HBET dissolved in toluene at basic pH.

Table S.1. Preconcentration efficiency (%) for Tl(I), Pb(II), V(V), Ti(IV), Ag(I) and Cr(III) at acid and basic pH values using a bulk liquid membrane (V_F : [Metal]=50 and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$; V_O : [2-HBET]= $1.42 \cdot 10^{-3}$ mol L^{-1} ; V_S : $[\text{HNO}_3]=0.3$ mol L^{-1} ; PF=22.73; $t=4$ h)

Metal	Concentration in feed phase (mg L^{-1})	pH value		Concentration in stripping phase (mg L^{-1})	Limit of detection (mg L^{-1})	% Preconcentration
		Initial pH	Final pH			
Tl(I)	100	4.0	4.2	0.316	0.030	14.0
Pb(II)	100	4.0	3.7	0.017	0.029	< LD
V(V)	50	4.0	4.2	0.015	0.027	< LD
Ti(IV)	50	4.0	4.0	0.006	0.035	< LD
Ag(I)	50	4.0	3.9	Precipitate	0.028	-
Cr(III)	50	4.0	4.1	Precipitate	0.018	-
Tl(I)	100	9.7	9.6	0.139	0.030	6.1
Pb(II)	100	9.7	9.6	0.998	0.029	44.0
V(V)	50	9.7	9.6	0.006	0.027	< LD
Ti(IV)	50	9.8	9.7	0.006	0.035	< LD
Ag(I)	50	9.6	9.5	-0.009	0.028	< LD
Cr(III)	50	9.7	9.7	0.003	0.018	< LD

As mentioned above, thiosemicarbazones can form selective and stable complexes with many metal ions because of the presence of donor atoms in its structure. 2-HBET is a multidentate ligand of transition metals capable of forming bonds with Pb(II) by means of five potential coordination sites (3N, 1O and 1S atoms), as seen in Figure S.4.

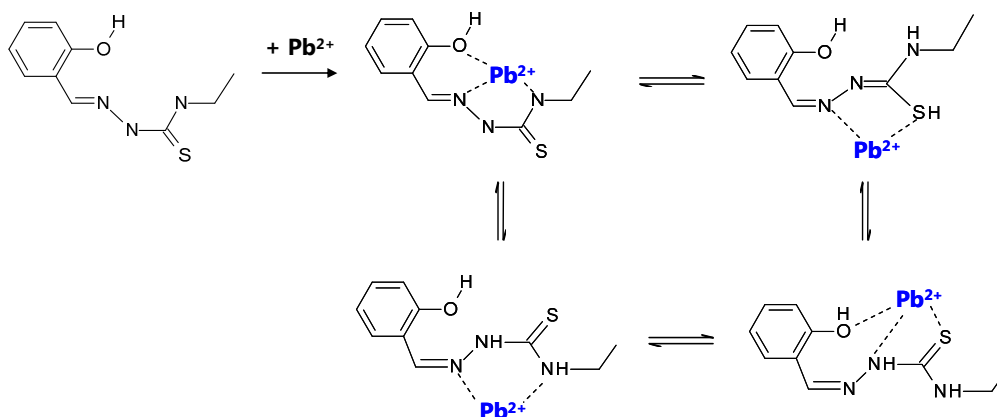


Figure S.4. Possible coordination points between thiosemicarbazone 2-HBET and Pb^{2+}

➤ Synthesis and stability of 2-HBET

Lead transport was facilitated by the addition of 2-HBET to the organic phase. Thiosemicarbazone 2-HBET was synthesized by a simple reaction between 2-hydroxybenzaldehyde (2-HB) and 4-ethyl-3-thiosemicarbazide (Sigma-Aldrich, Germany) (Figure S.5). Ethanolic solutions of 2-HB (1 ml in 20 ml) and ET (1.12 g in 20 ml) were mixed under reflux heating 10-15 min. After 24 hours crystals were filtered off and subsequently crystallized from 1:1 ethanol/water. Actually, Sigma-Aldrich Company (CAS number: 76572-70-8) supplies this ligand ($C_{10}H_{13}N_3OS$; formula weight: 223.3 g mol⁻¹) [<http://www.sigmaaldrich.com/>].

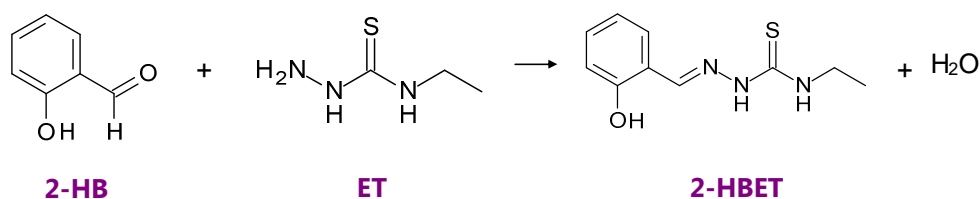


Figure S.5. Synthesis reaction of thiosemicarbazone 2-HBET

Since liquid membrane experiments required long preconcentration times (hours), the stability of 2-HBET in toluene was studied in order to evaluate if the carrier was modified or degraded. For this aim, the UV-Vis spectrum of 2-HBET in toluene (at $2.84 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹) was recorded to know the wavelength of maximum absorption ($\lambda_{\max}=338$ nm). Once λ_{\max} was known, absorbance measurements were carried out at different periods over time at 338 nm, concluding that 2-HBET in toluene was stable for at least 3 days. This fact allowed its use as a proper carrier in the bulk liquid membrane.

Results and discussion

➤ Optimization of the preconcentration procedure

Chemical and physical variables were studied in order to obtain the critical values for the maximum preconcentration efficiency using the liquid membrane separation method. These important parameters were: buffer solution and pH value of the feed solution, 2-HBET concentration in the liquid membrane, HNO₃ concentration in the stripping phase, preconcentration time and temperature.

(a) Effect of buffer solution and pH value

The pH is an important parameter that determines the formation of the metal-ligand complex in the interface between feed and organic phases. Hence, it is necessary to establish the adequate pH value of buffer solution allowing the chemical reaction. pH buffer solutions and values tested were:

- Ammonium chloride/ammonia ($\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$) buffer solution at pH 7.5; 8; 8.5; 9; 9.5 and 10.
- N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethane)sulfonic acid (HEPES) buffer at pH 7 and 8.
- Britton-Robinson buffer at pH 6, 7 and 8.

Before performing the experiments, the buffer concentration needed in the feed phase to maintain the pH was evaluated. This previous studies for $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ buffer are shown in Figure S.6. Increasing volumes of $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ (6 mol L^{-1}) were added to a 20 mL Pb(II) aqueous solution ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) at different pH values. As can be seen, from 2.5 mL of buffer (0.7 mol L^{-1}) the pH is kept constant for all pH values. To ensure the pH regulation, a concentration of 1.33 mol L^{-1} was selected for further studies (50 mL of $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ solution at 8 mol L^{-1} in 300 mL of solution). Similar studies were performed for HEPES (1 mol L^{-1}) and Britton-Robinson (1.5 mol L^{-1}) solutions, being necessary 50 mL of both of them (0.17 mol L^{-1} for HEPES and 0.25 mol L^{-1} for Britton-Robinson in the feed phase).

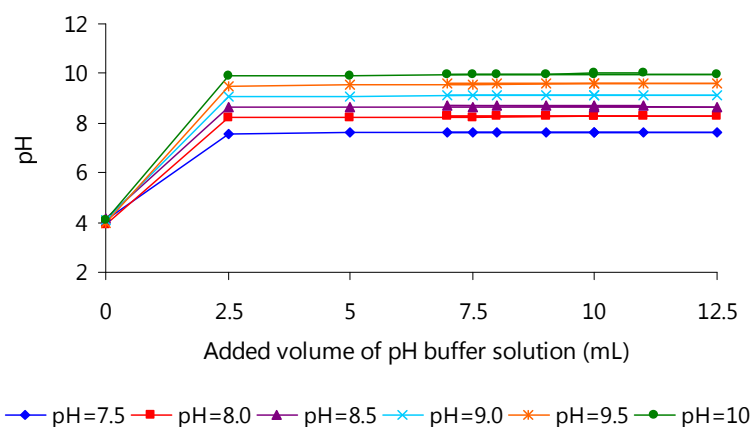


Figure S.6. Effect of the concentration of $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ buffer (6 mol L^{-1}) on the pH value in the feed phase (volume of 20 mL at $100 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II)) for different pH values

The results (Figure S.7) showed a maximum preconcentration rate (85.4%) using $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ buffer solution at pH 8-8.5. Therefore, this buffer was established to control the pH of the feed solution, with a final concentration of 1.33 mol L^{-1} .

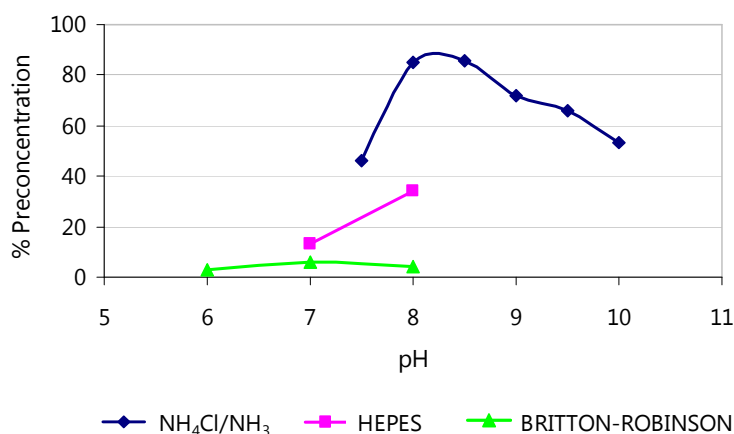


Figure S.7. Effect of different pH buffer solutions and pH values in the feed phase on the preconcentration efficiency (V_F : $[\text{Pb(II)}]=100 \mu\text{g L}^{-1}$; V_O : $[\text{2-HBET}]=1.42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; V_S : $[\text{HNO}_3]=0.3 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{PF}=22.73$; $t=4 \text{ h}$)

(b) Effect of 2-HBET concentration in the liquid membrane

Different amounts of 2-HBET dissolved in toluene were evaluated (0; 0.013; 0.016; 0.025; 0.051 and 0.127 g) for the separation/preconcentration of $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of Pb(II) . Thus, the molar ratio ligand/metal varied in the range: 0; 471; 600; 942; 1884 and 4710, while all other variables remained constant. The results from these studies can be observed in Figure S.8, where the absence of organic reagent did not produce transport of the metal ion, which means that Pb(II) transport is facilitated by the carrier.

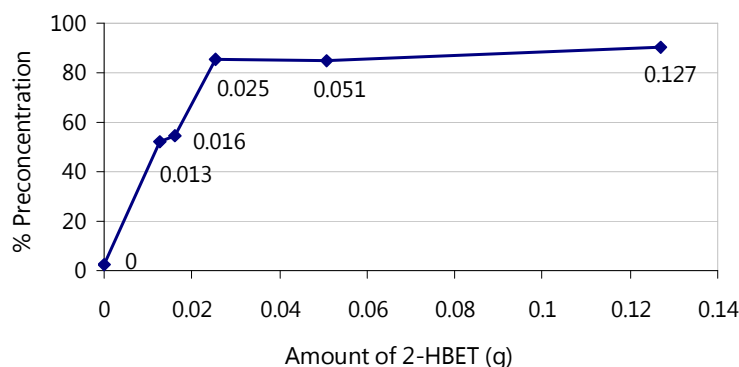


Figure S.8. Effect of 2-HBET concentration in the liquid membrane on the pre-concentration efficiency (V_F : $[Pb(II)] = 100 \mu g L^{-1}$; $[NH_4Cl/NH_3] = 1.33 mol L^{-1}$; V_S : $[HNO_3] = 0.3 mol L^{-1}$; $PF = 22.73$; $t = 4 h$)

Using low molar ligand/metal ratios, the amount of 2-HBET in toluene was not enough to reach the pre-concentration efficiency obtained with higher concentrations. Therefore, 0.025 g of 2-HBET was selected as optimum value due to higher amounts did not significantly increase the recovery and it was considered an unnecessary expenditure to add this excess.

(c) *Effect of the concentration of HNO_3 in the stripping phase*

The nitric acid in the receiving phase acts as a proton donor and, when the neutral complex reach this phase, it is destroyed by the acid and the metal ion becomes free in this solution. Furthermore, the driving force for the transport of lead ions is the pH gradient between the feed phase and the acid receiving solution. The concentration of HNO_3 was varied (0.1; 0.3; 0.5 and $1 mol L^{-1}$) while all other variables remained constant. Figure S.9 shows these experiments, where $0.3 mol L^{-1}$ solution offered the best results.

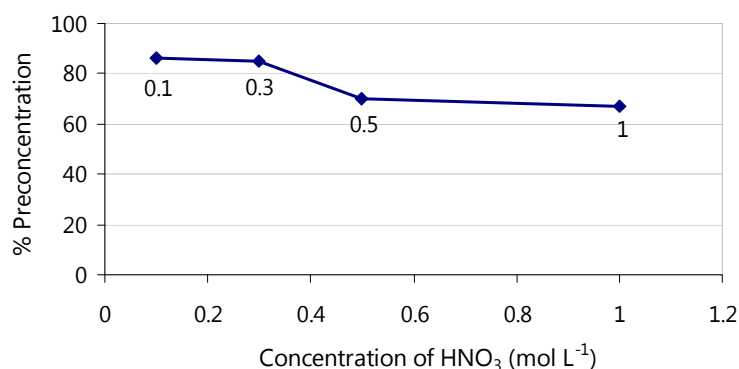


Figure S.9. Effect of HNO₃ concentration in the stripping phase on the preconcentration efficiency (V_F : [Pb(II)]=100 $\mu\text{g L}^{-1}$; [NH₄Cl/NH₃]=1.33 mol L⁻¹; V_O : [2-HBET]=1.42·10⁻³ mol L⁻¹; PF=22.73; t=4 h)

(d) Effect of preconcentration time

In previous studies Pb(II) concentration in feed phase was set at 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ in order to facilitate its subsequent determination by FAAS. This concentration was reduced until 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ since this concentration was actually much closer to the real data in natural waters. Lower concentrations were not employed because of the limit of detection of FAAS technique for Pb(II). In Table S.2 can be observed the comparison of the preconcentration efficiency for 100 and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Pb(II) in the feed phase. Low concentrations of Pb(II) (keeping constant the rest of parameters) produced a decrease in the preconcentration percentage, due to the fact that the time employed in preconcentration was not the optimum one. For this reason, preconcentration time was the next parameter under study with de aim to obtain the stationary and maximum transport for Pb(II).

Table S.2. Comparison of the preconcentration efficiency for different initial concentration of Pb(II) (V_F : [Pb(II)]=100 and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$; [NH₄Cl/NH₃]=1.33 mol L⁻¹; V_O : [2-HBET]=1.42·10⁻³ mol L⁻¹; V_S : [HNO₃]=0.3 mol L⁻¹; PF=22.73; t=4 h) (n=2)

[Pb(II)] in feed phase ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% Preconcentration
100	80.9 ± 1.3
25	69.9 ± 0.9

Preconcentration efficiency of Pb(II) across the bulk liquid membrane was study at different preconcentration times (4, 5, 7, 9 and 11 hours). As seen in Figure S.10 the preconcentration rate increased markedly from 4 to 7 hours and remained practically constant from that preconcentration time on. The equilibrium of the system was reached after 7 hours ($83.5 \pm 0.6\%$), while from that time on the system could not transport more metal ion.

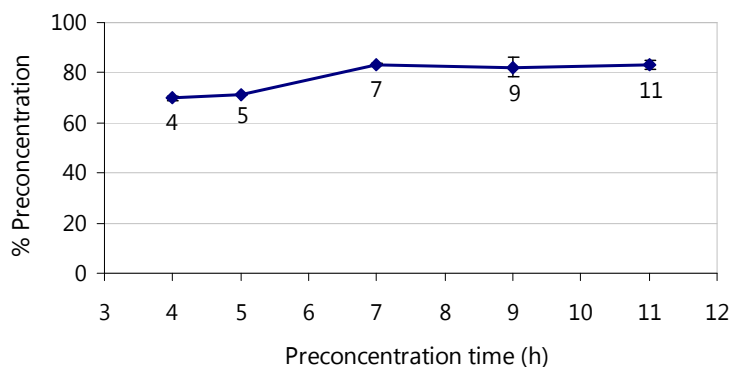


Figure S.10. Effect of preconcentration time on the preconcentration efficiency (V_F : $[\text{Pb(II)}]=25 \mu\text{g L}^{-1}$; $[\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3]=1.33 \text{ mol L}^{-1}$; V_O : $[\text{2-HBET}]=1.42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; V_S : $[\text{HNO}_3]=0.3 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{PF}=22.73$) ($n=2$)

(e) *Effect of temperature*

The temperature can influence the speed of the preconcentration transport. The diffusion process of the metal from the feed to the organic phase is a kinetic process that can be facilitated when there is an increase in the temperature of the system. In contrast, the temperature can cause a negative effect with consequent chemical degradation, such as carrier degradation. To evaluate the effect of the temperature in the system, a temperature significantly higher was selected (50°C). This temperature was controlled using a thermostatic bath. The influence of the temperature in the system was also studied. Table S.3 shows the variation of preconcentration yield of lead at 50°C and the comparison with the results at room temperature for different preconcentration times. Thus, it might be concluded that an increase in temperature did not improve the preconcentration yield for Pb(II). For 5 hours, the preconcentration efficiency was similar for both temperature values, while for 6 and 7 hours a decrease in efficiency was observed, which could be due to a possible

degradation of the carrier at 50 °C. Finally, subsequent experiments were performed applying a preconcentration time of 7 hours at room temperature.

Table S.3. Effect of temperature and preconcentration time on the preconcentration efficiency (V_F : $[\text{Pb(II)}]=25 \mu\text{g L}^{-1}$; $[\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3]=1.33 \text{ mol L}^{-1}$; V_O : $[\text{2-HBET}]=1.42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; V_S : $[\text{HNO}_3]=0.3 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{PF}=22.73$) ($n=2$)

Preconcentration time (h)	Temperature (°C)	% Preconcentration
3	50	52.1 ± 1.2
5	Room temperature	71.3 ± 0.1
	50	74.6 ± 1.6
6	50	66.2 ± 1.3
7	Room temperature	83.5 ± 0.6
	50	60.4 ± 0.7

➤ Effect of chloride ion and salinity of the sample

In order not to dilute the sample in excess during the application of liquid membrane process, further experiments were carried out using less volume of pH buffer solution. In relation with the previous Figure S.6, it was possible to control the pH of the feed phase with a minimum concentration of 0.7 mol L^{-1} . Hence, a concentration of 0.8 mol L^{-1} was also adequate and required less volume of buffer in the feed phase. So, the volume to add to the feed phase was 30 mL of a $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ (pH 8-8.5, 8 mol L^{-1}) solution rather than 50 mL. Table S.4 shows the results using this new volume of buffer. It can be observed a decrease in the preconcentration efficiency (from 83% to 70%). Therefore, the new volume controlled perfectly the pH in the feed phase.

Table S.4. Effect of the added volume of buffer solution in the feed phase on the preconcentration efficiency (V_F : $[\text{Pb(II)}]=25 \mu\text{g L}^{-1}$; V_O : $[\text{2-HBET}]=1.42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; V_S : $[\text{HNO}_3]=0.3 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{PF}=22.73$; $t=7 \text{ h}$) ($n=2$)

Volume of buffer solution (mL)	$[\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3]$ in feed phase (mol L^{-1})	pH value		% Preconcentration
		Initial pH	Final pH	
30	0.8	8.5	8.4	70.5 ± 1.5
		8.5	8.5	
50	1.33	8.5	8.4	83.5 ± 0.6
		8.4	8.3	

From these results, it can be concluded that the buffer solution used in the experiments had a double effect: to control the pH in the feed phase and to take an active part in the transport process. According to this, transport of lead across the liquid membrane would not have happened through a counter-transport mechanism (as it was proposed). Probably, it could have happened by means of a co-transport of Cl^- and Pb^{2+} to form the neutral complex in contact with the carrier in the organic phase. A scheme about this mechanism is illustrated in Figure S.11. In this case, the proton gradient do not participate in this process directly, but it would be involved in the formation of the complex in the organic (due to the reaction depends on the pH value) phase as well as in its destruction in the acid phase.

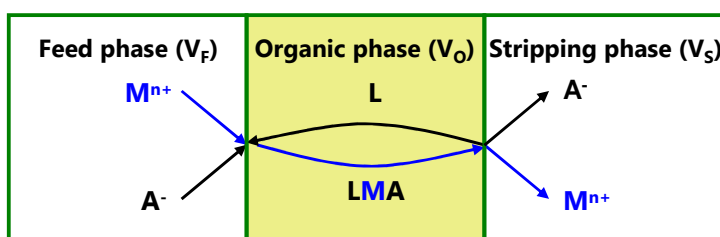


Figure S.11. Schematic mechanism of co-transport of metal ion in the bulk liquid membrane ($M=\text{Pb}^{2+}$; $A=\text{Cl}^-$; $L=\text{carrier}$)

Since the aim of this research is to implement the proposed bulk liquid membrane method to natural waters of different grade of salinity (including high salinity samples such as seawater), a variety of saline samples (10; 20; 30 and 40 g L^{-1} of NaCl) were studied. Sodium chloride was the salt used for being the majority salt in seawater. As seen in Figure S.12, the ion Cl^- is involved in Pb(II) transport process, where a concentration of 10 g L^{-1} of NaCl is sufficient to obtain the same preconcentration efficiency as in previous studies (with a final buffer concentration of 1.33 mol L^{-1}). As salinity increases, preconcentration efficiency keeps practically constant, so the system has reached its maximum capacity of transport.

Based on these studies, it might be concluded that the percentage of preconcentration was optimum for saline samples ($\geq 10 \text{ g L}^{-1}$ of NaCl), where a volume of 30 mL of buffer solution is adequate to produce the coupling co-transport process with satisfactory results. This method can be applied to seawater samples, becoming a method of huge interest due to the complexity of the saline matrix and the difficulties to be analysed by direct methods.

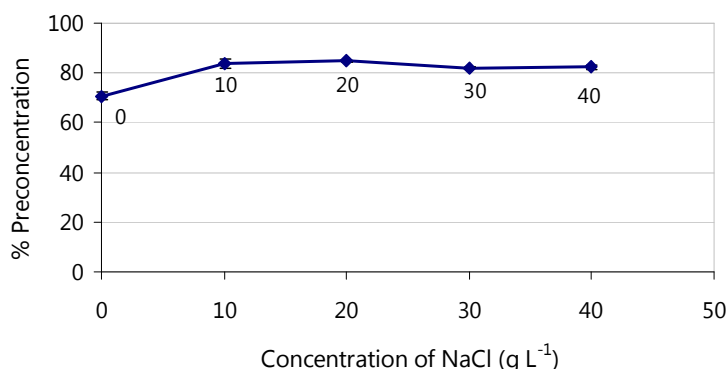


Figure S.12. Effect of the salinity of the sample on the preconcentration efficiency (V_F : $[\text{Pb(II)}]=25 \mu\text{g L}^{-1}$; $[\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3]=0.8 \text{ mol L}^{-1}$; V_O : $[\text{2-HBET}]=1.42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; V_S : $[\text{HNO}_3]=0.3 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{PF}=22.73$; $t=7 \text{ h}$)

Apart from these experiments, the content of Pb(II) present in the feed phase (in saline and non-saline samples) was determined by DPASV (Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry) in order to check the stability of the solutions with respect to time. After 7 hours, electro-analytical measurement indicated the stability and non-degradation of Pb(II) concentration.

➤ The proposed new preconcentration method

Analysis of lead in aqueous samples is performed using 270 mL of sample (containing a concentration of NaCl $\geq 10 \text{ g L}^{-1}$, either own or added). This volume is made up to 300 mL adding buffer $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ (8 mol L^{-1}) at pH 8-8.5. 250 mL of this solution is placed in the external compartment of the bulk cell (V_F); 11 mL of 0.3 mol L^{-1} HNO_3 is deposited in the internal compartment as stripping solution (V_S); and 80 mL of $1.42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ of 2-HBET in toluene is placed over both aqueous solutions (V_O). The cell is now covered with its corresponding cover plate to avoid possible contamination or the evaporation of the organic solvent. The system is stirred magnetically at 700 r.p.m during 7 hours at room temperature. The stripping phase is measured by flame atomic absorption.

It must be considered the dilution caused to the initial sample when the 30 mL of buffer are added. So, the preconcentration of the analyte from the sample to the stripping phase is 20.45 times (called preconcentration factor of the method, PFM).

➤ Analytical performance of the method

The performance characteristics of the proposed method were studied:

(a) *Repeatability of the method*

Repeatability is the variability of the measurements obtained by one person while measuring the same item repeatedly under similar conditions. When one of more conditions are changed, it is called reproducibility. The repeatability of the proposed method for the extraction and determination of lead was investigated and the average preconcentration efficiency of metal ion obtained from six replicate experiments was found to be **83.7 ± 2.5** (Table S.5). The *precision* of the method was calculated by using the Student's-t test applying the following expression (at confidence level of 95%):

$$Precision(\%) = \frac{s \cdot t}{\bar{x}(\sqrt{n})}$$

Table S.5. Repeatability of the method for preconcentration of Pb(II) (V_F : [Pb(II)]=25 $\mu\text{g L}^{-1}$; $[\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3]=0.8 \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NaCl}]=30 \text{ g L}^{-1}$; V_O : [2-HBET]= $1.42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; V_S : $[\text{HNO}_3]=0.3 \text{ mol L}^{-1}$; PFM=20.45; $t=7 \text{ h}$) ($n=6$)

Parameters	Values
% Preconcentration	87.93; 84.12; 84.54; 82.08; 82.05; 81.29
Mean (\bar{x})	83.67
Standard deviation (s)	2.45
Relative standard deviation $RSD(\%) = s / \bar{x} \cdot 100$	2.93
Confidence level	95%
Number of experiments (n)	6
Degrees of freedom (n-1)	5
<i>t</i> -Student value	2.571
Precision (%)	3.07

The precision obtained for the method using the Student's-t test was 3.07% (<5%), at a confidence level of 95%, showing a good precision for the proposed method.

(b) Sensibility of the method: Limits of detection and quantification

Six replicates of blank (samples prepared in Milli-Q deionised water without metal ion) were measured using optimal conditions. The average value was $0.757 \pm 0.130 \mu\text{g L}^{-1}$ of Pb(II). The limit of detection (LD) of the method, calculated as 3 times the standard deviation of blank samples ($n=6$), was $0.391 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II) and the limit of quantification (LQ), calculated as 10 times the standard deviation, was $1.305 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II). Blank samples were measured by GFAAS (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy), because detection limit of FAAS for lead was not enough ($94.5 \mu\text{g L}^{-1}$). Table S.6 shows all these results.

Table S.6. Concentrations in blank samples determined by GFAAS (in stripping phase). Calculation of limits of detection and quantification (V_F : $[\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3]=0.8 \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NaCl}]=30 \text{ g L}^{-1}$; V_O : $[\text{2-HBET}]=1.42 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; V_S : $[\text{HNO}_3]=0.3 \text{ mol L}^{-1}$; PFM=20.45; $t=7 \text{ h}$) ($n=6$)

Blank replicates	[Pb(II)] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	Concentration in stripping phase	Blank sample ⁽¹⁾
1	14.36	0.839
2	11.59	0.677
3	10.18	0.595
4	11.95	0.698
5	13.16	0.769
6	16.47	0.962
\bar{x}_{blank}	12.95	0.757
σ_{blank}	2.23	0.130
LD		0.391
LQ		1.305

⁽¹⁾ $C_{\text{blank}} = ([\text{Pb(II)}]_{\text{stripping phase}} / 20.45) \times 100 / 83.7$

(c) Linear dynamic range of the method

The separation/preconcentration procedure showed a linear response within the tested concentration range from 5 to $300 \mu\text{g L}^{-1}$ samples. Samples containing Pb(II) concentrations higher than $20 \mu\text{g L}^{-1}$ were determined by FAAS, and Pb (II) concentrations lower than $20 \mu\text{g L}^{-1}$ were analysed by GFAAS and ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry). In Figure S.13 are represented these studies.

Experimental samples concentrations (calculate from measured acid phases) are plotted against concentration added when the samples were prepared. The slope shows a value close to 1.

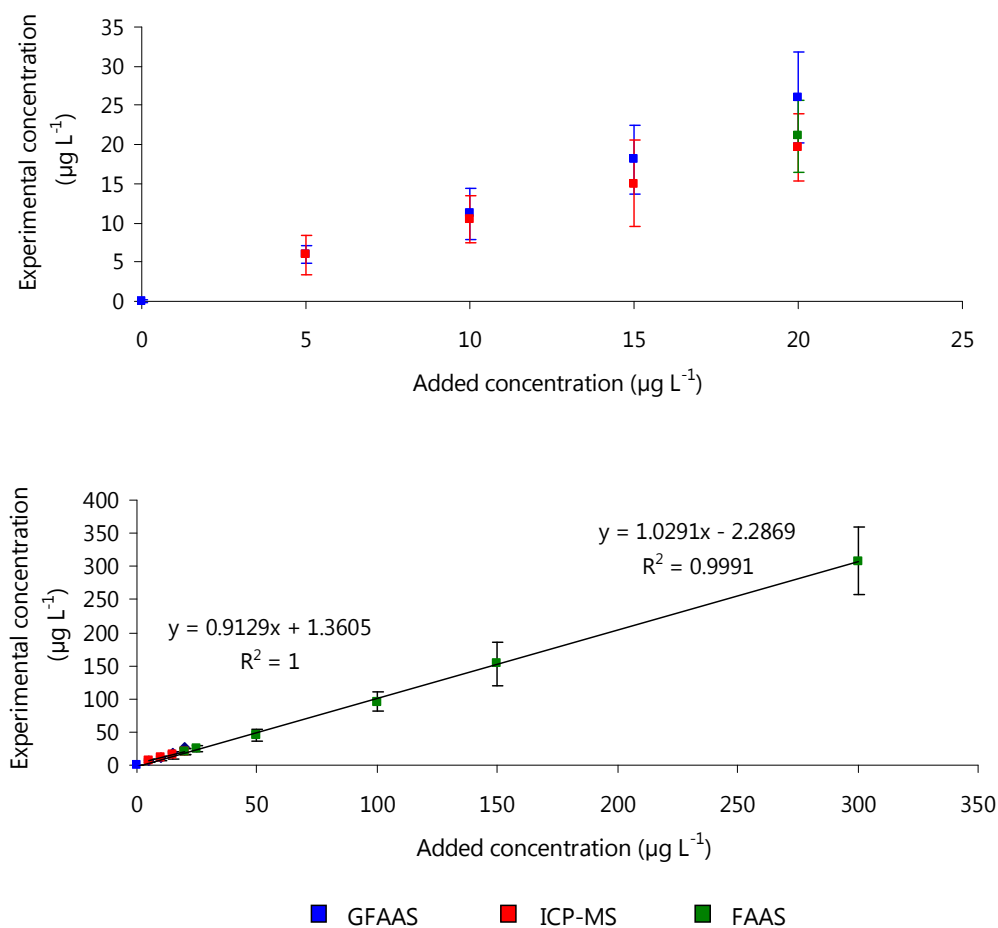


Figure S.13. Experimental concentration of Pb(II) against added concentration in different saline samples measured by GFAAS, FAAS and ICP-MS (V_F : [Pb(II)]=5-300 µg L⁻¹; [NH₄Cl/NH₃]=0.8 mol L⁻¹; [NaCl]=30 g L⁻¹; V_O : [2-HBET]=1.42·10⁻³ mol L⁻¹; V_S : [HNO₃]=0.3 mol L⁻¹; PFM=20.45; t=7 h) (n=2)

(d) Evaluation of saline and metal matrix in seawater

In order to evaluate the effect of saline and metal matrix in seawater on the preconcentration efficiency of Pb(II), synthetic samples were prepared. On the one hand, a saline synthetic sample was prepared using salt concentrations found in seawater [Grasshoff et al., 1999] (Table S.7) and on the other hand, another synthetic sample was prepared using higher concentrations of metal ions usually found in this kind of samples (Table S.8) [Crompton, 2007].

Table S.7. Composition of synthetic seawater employed in saline interference studies for the preconcentration of Pb(II) [Grasshoff et al., 1999]

Interfering substance		Concentration in synthetic seawater sample (g L ⁻¹)
Salt	Ions in solution	
NaCl	Na ⁺ , Cl ⁻	23.939
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Mg ²⁺ , Cl ⁻	10.825
Na ₂ SO ₄	Na ⁺ , SO ₄ ²⁻	3.994
CaCl ₂ ·H ₂ O	Ca ²⁺ , Cl ⁻	1.704
KCl	K ⁺ , Cl ⁻	0.677
NaHCO ₃	Na ⁺ , HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻	0.196
KBr	K ⁺ , Br ⁻	0.098
H ₃ BO ₃	H ₂ BO ₃ ⁻ , HBO ₃ ²⁻ , BO ₃ ³⁻	0.027
SrCl ₂ ·6H ₂ O	Sr ²⁺ , Cl ⁻	0.024
NaF	Na ⁺ , F ⁻	0.003

Table S.8 Concentration of metal ions in synthetic seawater employed for interference studies (based on Crompton, 2007)

Interfering metal ion	Metal concentration in synthetic sample	
	nmol L ⁻¹	µg L ⁻¹
Al(III)	100	2.70
Fe(III)		5.59
Mn(II)		5.49
Ni(II)		5.87
Cu(II)		5.09
V(V)		6.54
Zn(II)		6.35
Bi(III)	3	0.63
Cd(II)		0.34
Co(II)		0.18
Tl(I)		0.61

The results from these interference studies are summarized in Tables S.9 and S.10, indicating that saline and metal seawater synthetic matrices did not interference in lead determination by bulk liquid membrane method. This fact indicates that this method can be applied for analysed Pb(II) in this kind of complex samples.

Table S.9. Effect of saline composition in synthetic seawater sample on the preconcentration method (Table S.7) (V_F : [Pb(II)]=25 $\mu\text{g L}^{-1}$; [NH₄Cl/NH₃]=0.8 mol L⁻¹; V_O : [2-HBET]=1.42·10⁻³ mol L⁻¹; V_S : [HNO₃]=0.3 mol L⁻¹; PFM=20.45; t=7 h) (n=2)

Pb(II) concentration in synthetic sample	Analysis technique	Concentration in stripping phase ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Experimental concentration in the sample ($\mu\text{g L}^{-1}$)
25	FAAS	398.04 ± 0.79	23.25 ± 3.62

Table S.10. Effect of metal composition in synthetic seawater sample on the preconcentration method (Table S.8) (V_F : [Pb(II)]=25 $\mu\text{g L}^{-1}$; [NH₄Cl/NH₃]=0.8 mol L⁻¹; NaCl=30 g L⁻¹; V_O : [2-HBET]=1.42·10⁻³ mol L⁻¹; V_S : [HNO₃]=0.3 mol L⁻¹; PFM=20.45; t=7 h) (n=2)

Pb(II) concentration in synthetic sample	Analysis technique	Concentration in stripping phase ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Experimental concentration in the sample ($\mu\text{g L}^{-1}$)
25	FAAS	422.55 ± 4.22	24.68 ± 4.81

➤ Application of the preconcentration method to real samples

The method was also applied successfully to the analysis of dissolved Pb(II) in a real seawater sample collected from Algeciras Bay where was added Pb(II) in order to have a final concentration of 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Samples were filtered and UV digested in order to remove suspended and organic matter. The results (Table S.11) show satisfactory agreement between the experimental (bulk liquid membrane method) and the certified values (DPASV) (*Application Bulletin No. 231/2 e, Metrohm*). Comparison between two methods was studied using the Student's-t test, where significant differences at 95% confidence limit were not found.

Table S.11. Pb(II) concentration in real seawater obtained by liquid membrane method (n=2) (V_F : real seawater $[Pb(II)]=25 \mu g L^{-1}$ de Pb(II); $[NH_4Cl/NH_3]=0.8 \text{ mol } L^{-1}$; V_O : $[2\text{-HBET}]=1.42 \cdot 10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$; V_S : $[HNO_3]=0.3 \text{ mol } L^{-1}$; PFM=20.45; $t=7 \text{ h}$) (n=2) and DPASV reference method (n=4)

Sample	Pb(II) concentration ($\mu g L^{-1}$)	
	Liquid membrane (proposed method)+FAAS	DPASV (reference method)
Real seawater	25.18 ± 4.41	27.58 ± 1.72

Conclusions

Pb(II) can be effectively transported, through a liquid membrane of toluene containing 2-HBET, from a saline sample ($\geq 10 \text{ g } L^{-1}$). The efficiency of the process is 83.7 ± 2.5 at 7 h. The method has a lead preconcentration factor of 20.45 (considering the dilution factor). This system permits the separation, preconcentration and quantitative determination of lead in natural water, where samples at low levels of metal concentration ($< 20 \mu g L^{-1}$) can be determined using GFAAS or ICP-MS and concentrations $> 20 \mu g L^{-1}$ can be analysed by FAAS. In conclusion, the proposed method can be applied satisfactorily to the analysis of seawater with complex saline and metal matrices, allowing measurements by AAS, a common and simple technique but in which saline ions interfere when this complex samples are analysed directly.

Chapter III

Photophysical investigation of two Schiff bases for iron determination in aqueous solution

Iron(III) is an essential element for fundamental metabolic processes in cells and organisms. It participates in a wide variety of metabolic processes, including oxygen transport, synthesis of DNA, RNA or proteins, and electron transport. The basis to systemic iron supply and homeostasis lies in the regulation of adequate plasma iron levels. A constant balance between iron uptake, transport, storage and utilization is required to maintain iron homeostasis. Disruptions in iron homeostasis from both iron deficiency and overload account for some of the most common human diseases (ranging from anemia to iron overload and, possibly, to neurodegenerative diseases [Lieu et al., 2001; Hentze et al., 2010]). In water environment, iron acts like an important limiting element for phytoplankton primary productivity. Hence, it is very essential to establish accurate and simple methods for the rapid determination of iron(III) due to its important role in environment and biological media [Du et al., 2013].

Many methods have been employed to determinate iron concentrations in aqueous medium including inductively coupled plasma mass (ICP-MS), atomic absorption, colorimetry, flow injection and electrochemical methods. However, in recent years fluorescent approaches based on fluorescent optical sensors, have gained greater attention due to their simple equipment, rapid response time, high selectivity, sensitivity, versatility, easy operation and freedom from electrical interference [Du et al., 2013]. Other additional advantage of these systems is their possibility of miniaturization, that can deliver real time and *in situ* studies [Ensafi and Fooladgar,

2011]. Miniaturized optical components, such as light sources, photodetectors and light guiding structures, offer an enhanced performance and a feasible mass production at low cost, and allow us to measure at large distances for *in situ* monitoring of the environmental or medical parameters [Orellana and Moreno-Bondi, 2005]. Therefore, a large number of fluorescent sensors for interesting metal ions have been successfully developed and applied in medicine, biology and environment [Jiang et al., 2014].

A fluorescent sensor is an optical chemical sensor that provides information about presence of certain components of a complex sample in a real time (on-line), by changes in the fluorescence behaviour of the sensitive reagent or indicator. According to IUPAC chemical sensors transform chemical information (concentration, activity of chosen species or even general composition of a sample) into analytically useful signal. Chemical sensors are commonly classified according to the transducing mode of the signal into following groups: electrochemical (potentiometric, amperometric and conductometric), optical (based on: absorption spectroscopy, fluorescence and phosphorescence spectroscopy, chemiluminescence, refractive index sensing e.g. surface Plasmon resonance (SPR), light scattering), mass (surface acoustic wave (SAW), quartz crystal microbalance (QCM), mechanical), thermal and other (magnetic etc.) [Alegret et al., 2004; Pietrzak, 2013]

Chemical sensors operation mechanism consists of three stages: (1) *Capture and Recognition* (Binding between sensing site or ligand and target analytes. This process induces the sensing effect or chemical changes); (2) *Transduction* (Conversion of the detection event into a measurable signal. Most transducers are physical sensors themselves than convert the sensing effect of molecular binding into measurable electrical signals); (3) *Measurements and Analysis* (Signal from the transducer is measured or recorded, and interpreted. This step is mostly done by digital processors or computers) [Zhang and Hoshino, 2014].

Fiber-optic sensors (also called optical fiber sensors or optodes) are analytical devices incorporating *optical fibers*, defined as small and flexible "wires" made out of glass or plastic that can transmit light signals, with minimal loss, over long distances. In the last decades this fibers have been widely applied in optrodes or bio-optrodes instrumentation. The main components of an optrode are: (1) a light source; (2) an optical fiber to transmit the light; (3) the sensing material, which is usually immobilized to the surface of the end face of the fiber; (4) a detector to measure the output light signal. Finally, the optrode instrumentation is controlled by computers or microprocessors and they are employed to analyze the output signals. The principal element of the optrode is the sensing element, which can be immobilised directly on the optical fiber or onto an inert solid and stable support by physical or chemical methods. One of the most attractive features of optical fibre chemical sensors is that

they can be easily miniaturised [Narayanaswamy, 2001; Biran et al., 2008; Gangaiya and Mahendra, 2008].

Thus, the design of selective and sensitive quantitative fluorescent chemosensors for the determination of iron and other metal ions has attracted wide-spread attention. Some papers have shown the application of different immobilized and dissolved fluorescent sensors for iron determination in aqueous solution. Before years 2011/2012, Fe^{3+} -selective fluorescent sensor were relatively rare being more common for metals as Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} or Hg^{2+} [Noiré and Duréault, 1995; Pulido-Tofiño et al., 2000; Oter et al., 2007; Lin et al., 2009; Li et al., 2012; Liu and Wu., 2012; Queirós et al., 2012; She et al., 2012]. However, they have experienced a huge boom in the last two years, after our studies were carried out [Hu et al., 2013b; Liu et al., 2013; Shamsipur et al., 2013; Yi et al., 2013; Gao et al., 2014; Li et al., 2014a; Li et al., 2014b; Li et al., 2014c; Wang et al., 2014].

Schiff bases (imines) are known as the good ligands for metal ions. Schiff bases and their transition metal complex are well known in the antibacterial, antifungal, anticancer, clinical, analytical and pharmacological area and as magnetic materials [Liu et al., 2011]. Thiosemicarbazones has a great affinity for Fe(III) acting as chelating molecules to remove or prevent incorporation of iron in enzymes. For this reason, iron-chelators have been used as such or in combination with other drugs in anti-proliferative therapy [Natarajan and Mathews, 2011]. Thiosemicarbazones are a type of hydrazones (Schiff base) that have shown good results as complexing agents in the spectrophotometric and extractive spectrophotometric determination of various metal ions [Koduru and Lee, 2014].

In this Chapter, two fluorescent sensors based on Schiff bases (2-hydroxynaphthaldehyde-N-phenylthiosemicarbazone (2-HNPT) and 2,6-bis(N-(2-hydroxy-1-naphthylmethylene)-diamino)pyridine (2,6-HNDP), shown in Figure S.14, have been synthesised and applied for the determination of Fe(III) in aqueous based solution. These studies can be considered as the starting point for further developments of fibre-optic sensors based in Schiff base reagents.

In fluorescent optical sensors, there are three ways of observable change in the fluorescence emission by the fluorophore: fluorescence enhancement, fluorescence quenching and emission shifting [Lakowicz, 2006].

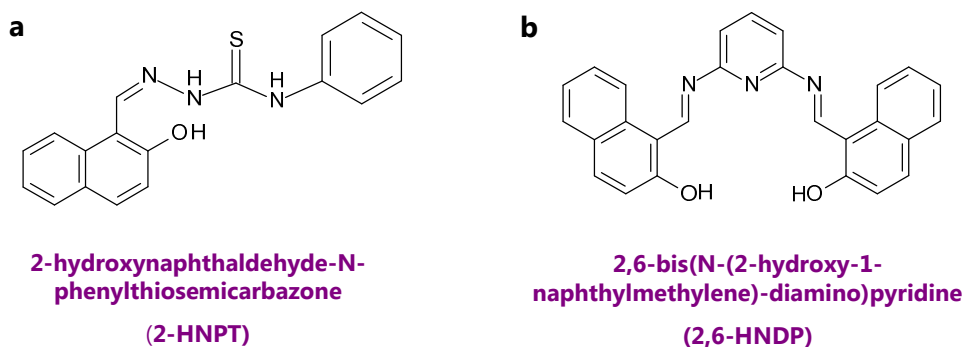


Figure S.14. Schiff bases (2-HNPT and 2,6-HNDP) applied in fluorescence studies

Sensor a: 2-hydroxynaphthaldehyde-N-phenylthiosemicarbazone (2-HNPT)

➤ Synthesis of 2-HNPT

This thiosemicarbazone was synthesised in one easy step by the condensation reaction of 2-hydroxy-1-naphthaldehyde (2-HN) (0.5 g, 2.9 mmol) with 4-phenylthiosemicarbazide (PT) (0.49 g, 2.9 mmol) dissolved in 15 mL of dimethylformamide (DMF) at room temperature. After stirring for 18 h, the solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product recrystallised from hot ethanol. The resulting yellow crystals were dried in vacuo to yield 0.61 g of the product (65% of yield) (Figure S.15).

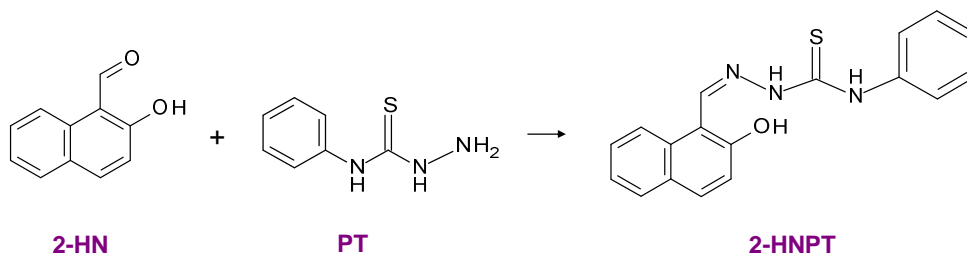


Figure S.15. Synthesis reaction of thiosemicarbazone 2-HNPT

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and mass spectra were recorded in order to validate the synthesis reaction (see *Supplementary information* at the end of this chapter).

Data for 2-HNPT: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): 6.95 (2H, m, Ar-H), 7.14 (3H, m, Ar-H), 7.32 (3H, m, Ar-H), 7.61 (2H, m, Ar-H), 8.23 (1H, s, Ar-H), 8.90 (1H, s, CH=N), 9.80 (1H, s, NH), 10.34 (1H, s, OH), 11.50 (1H, s, NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz DMSO-d_6): 110.2, 119.0, 124.0, 125.6, 128.6, 129.2, 132.1, 133.1, 139.7, 144.0, 157.1. **MS:** Calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{SO}$ = 321.4 g mol^{-1} , found 321.1.

➤ *Optical characterisation of 2-HNPT*

Firstly, the organic reagent was studied spectrophotometrically, using a solution of 2-HNPT buffered at pH 7.4 with N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES buffer, 1 mol L^{-1}). A volume of 10 mL of sensor solution was prepared, by taking 1 mL of an initial solution of 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in tetrahydrofuran:water (THF:H₂O) (9:1) and adding 1 mL of aqueous buffer. Finally, it was made up to volume with THF:H₂O (9:1) solvent. Final concentration of 2-HNPT was 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in a THF:H₂O (4.26:1) medium. The UV-Vis spectrum of 2-HNPT (Figure S.16) is characterised by a broad absorption from 210 to 450 nm. Within this broad absorption profile there is evidence of four main peaks with λ_{max} values of 210, 245, 320 and 370 nm. The 210 and 245 nm peaks are consistent with $\pi\text{-}\pi^*$ transitions of the aromatic rings, the 320 nm peak with a $\pi\text{-}\pi^*$ transitions of the C=N group while the 370 nm band reflects an intramolecular charge transfer (CT) band of the entire conjugated molecule [Issa et al., 2008].

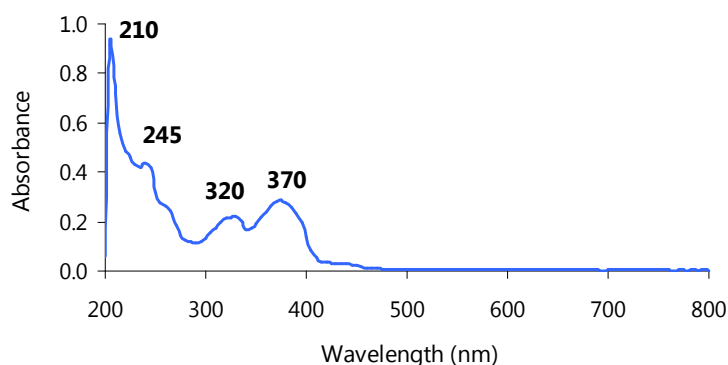


Figure S.16. UV-Vis spectrum for 2-HNPT in aquo-organic solution THF:H₂O (4.26:1) buffered at pH 7.4 ([2-HNPT]=10 $\mu\text{mol L}^{-1}$)

The fluorescence spectrum of 2-HNPT, recorded in a HEPES buffered solvent system (pH 7.4), is shown in Figure S.17. When excited at 375 nm (λ_{exc} =375 nm) in the

same solvent system, the fluorescence spectrum exhibited two main bands in the visible region with λ_{max} values of 425 and 485 nm. The presence of two bands in this spectrum enables the possibility of ratiometric analysis by comparing the ratio of the intensities of the two bands as a function of analyte concentration. This is preferred over single wavelength analysis as the method is free from the errors associated with receptor concentration, photobleaching and environmental effects [Singh et al., 2008].

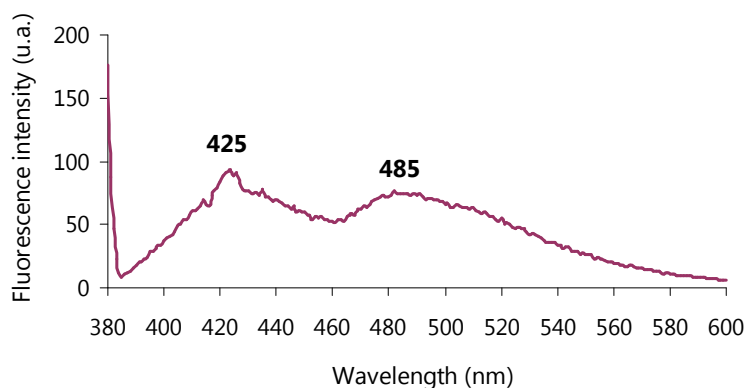


Figure S.17. Fluorescence spectrum for 2-HNPT in aquo-organic solution THF:H₂O (4.26:1) buffered at pH 7.4 ([2-HNPT]=10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; λ_{exc} =375 nm)

➤ Effect of pH on sensor fluorescence

First, the effect of pH on the fluorescence intensity of the sensor was investigated, by recording the fluorescence spectra over a range of different pH values. pH values were adjusted by the addition of HCl and NaOH on the sensor solution (at 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in THF:H₂O (9:1)). The emission intensity at 485 nm was plotted as a function of pH and this plot is shown in Figure S.18. These results illustrate that the fluorescence intensity remains relatively constant from pH 2–9, but increases dramatically from pH 10–12. This large increase in fluorescence is most likely caused by the deprotonation of the naphthalene hydroxy group which had consequences over the fluorescence emission process. These results showed that emission intensity of 2-HNPT remained constant in the physiological range.

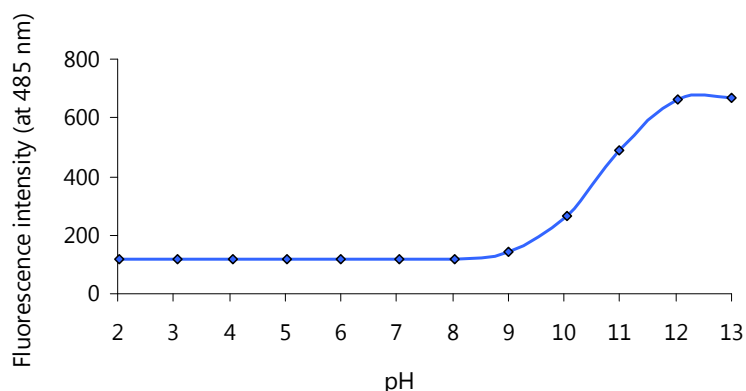


Figure S.18. Plot of fluorescence intensity against pH for 2-HNPT ([2-HNPT]=10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, solvent: THF:H₂O (9:1) buffered at pH 7.4; λ_{exc} =375 nm)

The pKa of the hydroxy group was calculated using a derivation of the Henderson Hasselbach equation [Kamila et al., 2007]:

$$\log(I_{\text{max}} - I) / (I - I_{\text{min}}) = -\text{pH} + \text{pKa}$$

where I_{max} is the maximum fluorescence intensity, I_{min} the minimum fluorescence intensity and I the measured fluorescence intensity obtained after each iron addition. By plotting $-\log(I_{\text{max}} - I) / (I - I_{\text{min}})$ against pH , the pKa of this group was calculated to be 10.62 (value obtained by dividing the intercept value by the slope).

➤ Study of the sensor 2-HNPT for the determination of metal ions

The selectivity of Sensor 2-HNPT was tested over a range of environmentally and biologically important metal ions, such as Li(I), Na(I), Mg(II), K(I), Ca(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Sr(II), Ag(I) and Ba(II). A volume of 10 mL of solution containing sensor and metal was prepared for each metal ion. In each volumetric flask was added: 1 mL of HEPES buffer (pH 7.4), 1 mL of sensor solution (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in THF:H₂O (9:1)) and 1 mL of metal aqueous solution (250 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Finally, it was made up to volume with THF:H₂O (9:1) solvent. Final concentrations in aquo-organic solution THF:H₂O (2.57:1), were 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of sensor and 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of metal. UV-Vis spectra for these solutions are shown in Figure S.19. All the solutions showed a pale yellow colour, except for Cu(II), which was more intensive (at 425 nm).

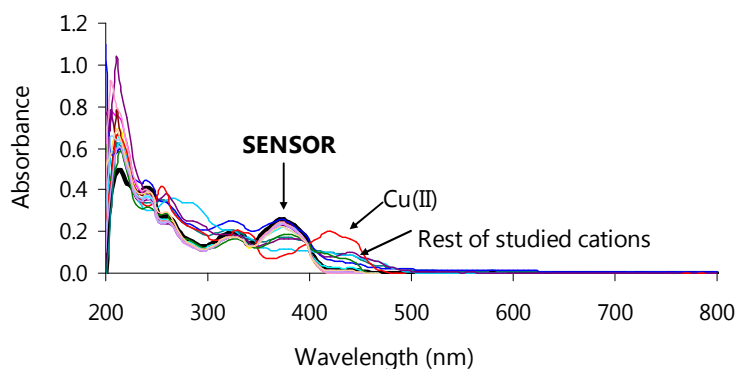


Figure S.19. UV-Vis spectra of 2-HNPT in absence and presence of metal ions (in THF:H₂O (2.57:1) buffered at 7.4 solution): Li, Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Sr, Ag, Ba and Pb ([2-HNPT]=10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and [Metal]=25 $\mu\text{mol L}^{-1}$)

The addition of Li(I), Na(I), Mg(II), K(I), Ca(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Sr(II), Ag(I) and Ba(II) caused virtually no change to the fluorescence spectrum of 2-HNPT. The addition of Pb(II) caused a minor increase in both bands while the addition of Cu(II) led to a slight decrease of the 425 nm band with a significant quench of the 485 nm band. Nevertheless, the addition of Fe(III) resulted in a significant increase of both bands with a 104% increase for the 425 nm band and a 194% increase for the 485 nm band (Figure S.20).

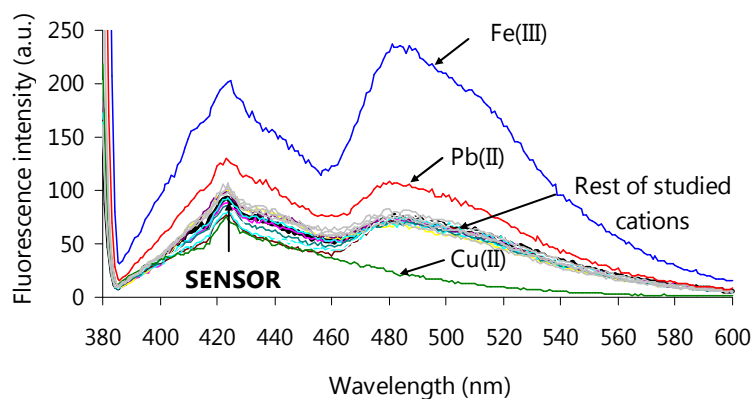


Figure S.20. Fluorescence spectra of 2-HNPT in absence and presence of metal ions (in THF:H₂O (2.57:1) buffered at 7.4 solution): Li, Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Sr, Ag, Ba and Pb ([2-HNPT]=10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and [Metal]=25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; λ_{exc} =375 nm)

The reason of the large fluorescent enhancement upon the addition of iron can be explained as follows: iron is known to form a tridentate chelate with thiosemicarbazones such as 2-HNPT sensor, where the oxygen lone pair from the naphthyl hydroxyl, the imine nitrogen lone pair and the thiosemicarbazone sulfur lone pair, all bind strongly to Fe(III) ion [Antholine et al., 1977]. This binding event prevents the rapid isomerisation of the C=N group that otherwise happens in the absence of Fe(III) and which leads to non-radiative decay of the excited state [Bhardwaj et al., 2008]. Examples of "Off-On" fluorescence probes for Fe(III) are rare given in the redox nature of this ion as it typically quenches the excited state of organic fluorophores by electron transfer processes when brought into close proximity on the fluorophore [Fabbri et al., 1995; Singh et al., 2009a; Singh et al., 2009b]. In the case of this sensor, the enhancement in fluorescence that arises as a result of the inhibition of the C=N isomerisation process is greater than the quenching ability of Fe(III) and an 'Off-On' response was observed.

Consequently, in view of the results obtained, the complex 2-HNPT-Fe(III) was extensively studied in order to develop a new method for the determination of Fe(III) in solution using fluorescence measurements.

➤ Stoichiometry studies for the complex 2-HNPT-Fe(III)

In order to determine the binding stoichiometry between 2-HNPT and Fe(III) a Job plot method was carried out [Job, 1928; Kirkbright et al., 1965; Skoog, 2005]. Job's method, also called "the method of continuous variation", is a simple and effective approach to the determination of chemical reaction stoichiometry. The solutions employed in these studies were prepared as shown in Table S.12.

Table S.12. Composition of the different solutions of 2-HNPT and Fe(III) used for stoichiometry studies (Job's plot method) in THF:H₂O (2.57:1) medium

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sol. A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sol. B	0	0.15	0.2	0.3	0.5	0.65	0.75	0.8	0.875	1
Sol. C	1	0.85	0.8	0.7	0.5	0.35	0.25	0.2	0.125	0
H ₂ O	1	0.85	0.8	0.7	0.5	0.35	0.25	0.2	0.125	0
χ_{Fe}	0	0.15	0.2	0.3	0.5	0.65	0.75	0.8	0.875	1
I_{485}/I_{425}	1.534	2.416	2.536	3.269	3.497	2.055	1.087	1.032	0.838	0.105

Final volume of the solution: 10 mL (make up to volume with THF:H₂O 9:1)

Sol. A: mL of HEPES buffer at pH 7.4

Sol. B: mL of aqueous solution of Fe(III) $1.5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Sol. C: mL of 2-HNPT solution in THF:H₂O (9:1) $1.5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Fluorescence ratio I_{485}/I_{425} was plotted against molar fraction of Fe in Figure S.21, where it can be observed the formation of a 1:1 (host/guest) complex.

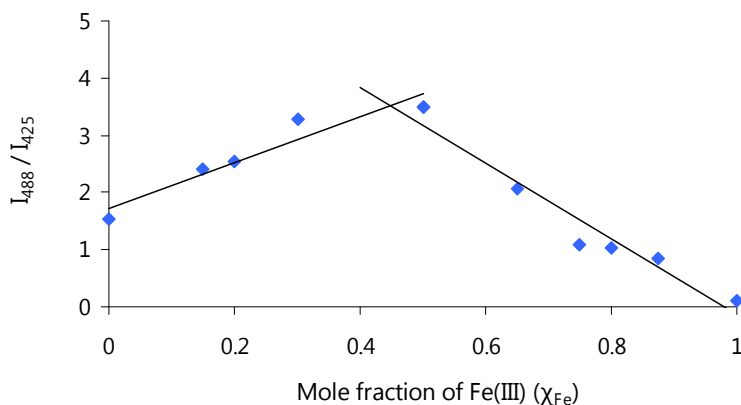


Figure S.21. Stoichiometry studies for 2-HNPT-Fe(III) complex using Job's plot method. (Conditions: Table S.12)

➤ Applicability range of the sensor 2-HNPT for the determination of Fe(III) in solution

The linear dynamic range of the proposed method was calculated by addition of increasing amount of Fe(III) to a 2-HNPT solution (keeping it constant). Different solutions were prepared as follows (in a total volume of 10 mL): 1 mL of HEPES buffer at pH 7.4 (to control the solution pH value), 1 mL of sensor solution (prepared at $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ in THF:H₂O (9:1)) and gradually increase concentrations of metal. Finally, it was made up to volume with THF:H₂O (9:1) solvent, obtaining a final aquo-organic medium composed by THF:H₂O (2.57:1) in every solution. The fluorescence of each solution was measured and the ratiometric intensity (I_{485}/I_{425}) plotted against gradually increase concentration (shown in Figure S.22). As it can be seen, the fluorescence intensity of the ligand in aquo-organic solution showed an increase of 425 and 485 nm bands upon excitation at 375 nm.

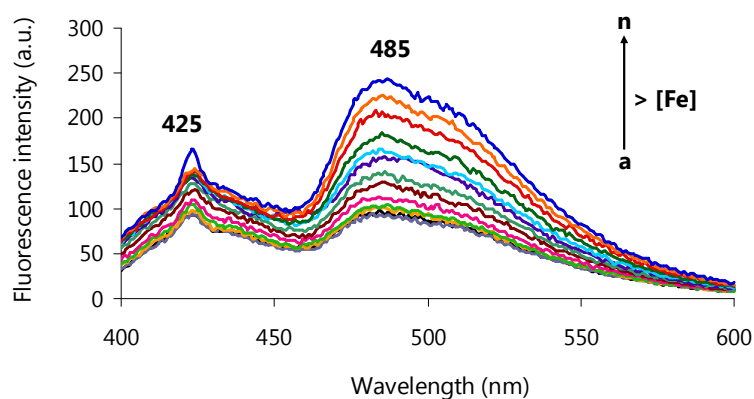


Figure S.22. Fluorescence emission spectra of 2-HNPT in aquo-organic solution THF:H₂O (2.57:1) buffered at pH 7.4. Conditions: [2-HNPT]=10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Fe(III)] ($\mu\text{mol L}^{-1}$): (a) 0; (b) 3.7; (c) 7.5; (d) 12.5; (e) 15; (f) 17.5; (g) 20; (h) 22.5; (i) 25; (j) 27.5; (k) 30; (l) 32.5; (m) 35; (n) 37.5; λ_{exc} =375 nm

The fluorescence intensity ratio I_{485}/I_{425} was represented against the iron concentration in Figure S.23. Excellent linearity was observed in the 15–37.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ range, indicating that the Schiff base 2-HNPT could function as a ratiometric fluorescent sensor “Off-On” for Fe(III) determination in that range.

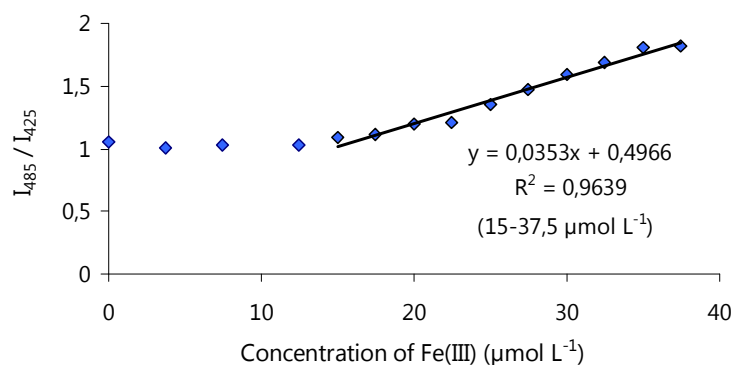


Figure S.23. Plot of the ratiometric fluorescence intensity of 2-HNPT (I_{485}/I_{425}) against Fe(III) concentration in THF:H₂O (2.57:1) buffered at pH 7.4

To obtain the binding constant ($\log \beta$) of the ligand-metal complex, the Henderson-Hasselbalch equation was used, which was employed to get the pK_a value, but in this occasion the term $-pH$ is replaced by $-\log[\text{cation}]$ and pK_a by $\log \beta$ [de Silva and Gunaratne, 1990; de Silva et al., 1995]. With these changes, the final expression is:

$$\log(I_{\max} - I) / (I - I_{\min}) = -\log[\text{cation}] + \log \beta$$

where I_{\max} is the maximum fluorescence intensity, I_{\min} the minimum fluorescence intensity and I the measured fluorescence intensity obtained after each iron addition. Based on a 1:1 binding stoichiometry the binding constant was calculated to be 4.56 (value obtained by dividing the intercept value by the slope).

➤ Selectivity studies

Finally, the effect of different metal ions (Li(I), Na(I), Mg(II), K(I), Ca(II), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Sr(II), Ag(I), Ba(II) and Pb(II)) was evaluated comparing the changes caused fluorescence intensity in relation to the initial intensity of the sensor. Different solutions were prepared for each metal ion with a final concentration of $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ for 2-HNPT and $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ for cation in a medium composed by THF:H₂O (2.57:1) buffered at 7.4 with HEPES solution. In Figure S.24 are plotted I/I_0 ratios in each study, where I is the intensity of the solution after the metal addition and I_0 is the initial fluorescence intensity of 2-HNPT (without metal addition) at 485 nm. No one metal produces such fluorescent enhancement as Fe. These results implied that the selectivity of the reagent for Fe(III) was remarkable and suitable in this aquo-organic system.

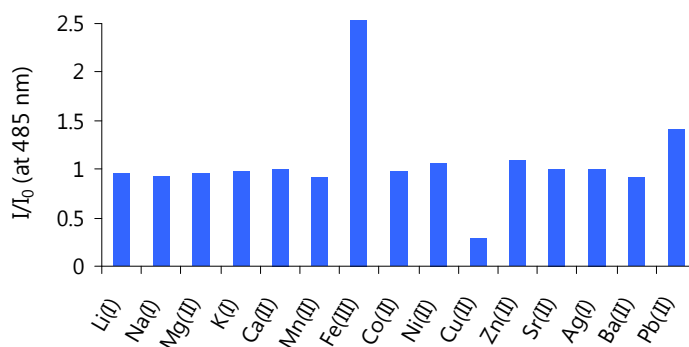


Figure S.24. Effect of metal ions on fluorescence of 2-HNPT in aquo-organic solution THF:H₂O (2.57:1) buffered at pH 7.4. Conditions: [2-HNPT] = $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; [Metal] = $25 \mu\text{mol L}^{-1}$; λ_{exc} = 375 nm

Sensor b: 2,6-bis(N-(2-hydroxy-1-naphthylmethylene)-diamino)pyridine (2,6-HNDP)➤ Synthesis of 2,6-HNDP

The reagent 2-hydroxy-1-naphthaldehyde (2-HN) (1.66 g, 9.65 mmol) was added to 2,6-diaminopyridine (2,6-DP) (0.5 g, 4.58 mmol) in DMF (15 mL) at room temperature. After stirring over night, the solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product dissolved in hot ethanol and filtered. Upon cooling an orange coloured product was obtained and dried in vacuum to yield 1.24 g of 2,6-HNDP (65% of yield) (Figure S.25).

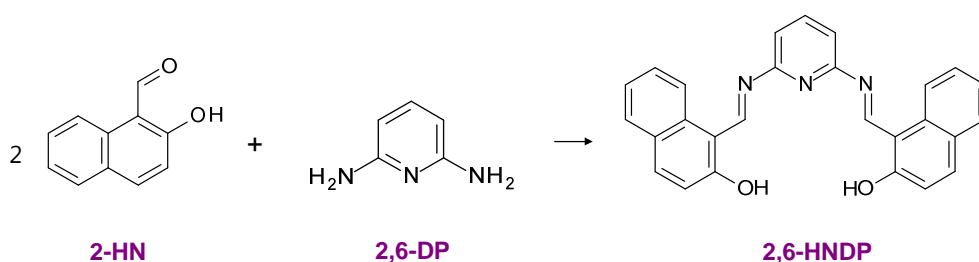


Figure S.25. Synthesis reaction of the pyridine derivate Schiff base 2,6-HNDP

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and mass spectra were recorded in order to validate the synthesis reaction (see *Supplementary information* at the end of this chapter).

Data for 2,6-HNDP: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): 6.96 (2H, d, Pyr-H), 7.05 (2H, d, Naph-H), 7.38 (2H, dd, Naph-H), 7.59 (2H, dd, Naph-H), 7.68 (2H, d, Naph-H), 7.82 (3H, m, Pyr-H, Naph-H), 8.19 (2H, d, Naph-H), 10.04 (2H, d, CH=N). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz DMSO-d_6): 112.9, 119.2, 122.5, 124.7, 128.0, 129.3, 129.7, 132.2, 138.8, 164.3, 193.4. **MS:** Calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$ = 417.5 g mol^{-1} , found 417.3.

➤ Optical characterisation of 2,6-HNDP

First of all, this synthesised compound was studied spectrophotometrically, using a solution of 2,6-HNDP buffered at pH 7.0 with N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES buffer, 1 mol L^{-1}). A volume of 10 mL of sensor solution was prepared, by taking 1 mL of an initial solution of 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in THF:H₂O (9:1) and adding 1 mL of aqueous buffer. Finally, it was made up to volume with THF:H₂O (9:1)

solvent. Final concentration of 2,6-HNDP was $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ in a THF:H₂O (4.26:1) medium. The UV-Vis spectrum of the organic reagent recorded in a THF:H₂O solvent system buffered at pH 7.0, shown in Figure S.26, exhibited two main bands at λ_{max} 280 and 475 nm, reflecting the aryl and naphthalene chromophores respectively.

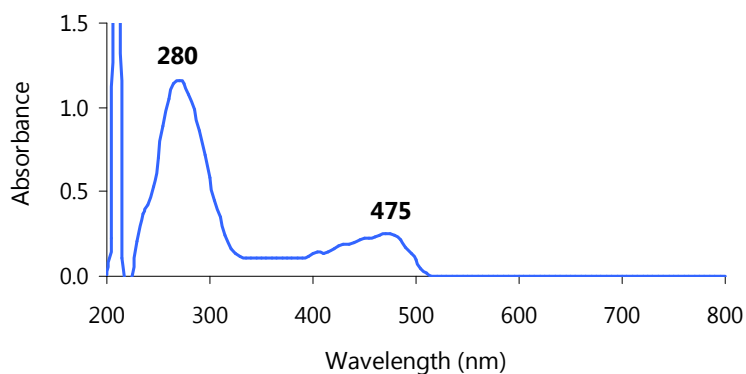


Figure S.26. UV-Vis spectrum for 2,6-HNDP in aquo-organic solution THF:H₂O (4.26:1) buffered at pH 7.0 ([2,6-HNDP]= $10 \mu\text{mol L}^{-1}$)

The fluorescence properties of 2,6-HNDP were then investigated again in a THF:H₂O solvent system buffered at pH 7.0. When excited at 475 nm a broad fluorescence emission was observed with λ_{max} =507 nm, which can be observed in Figure S.27.

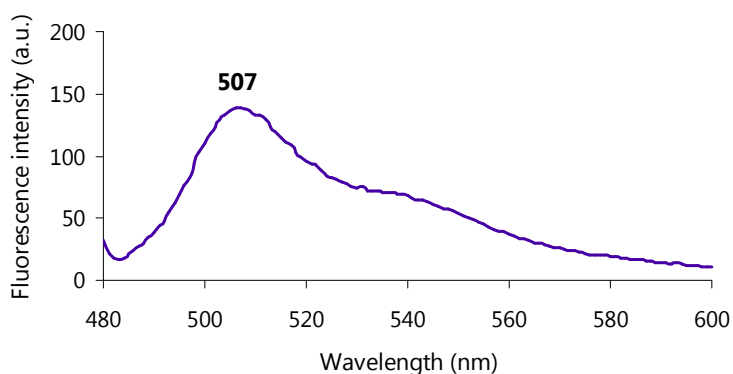


Figure S.27. Fluorescence spectrum for 2,6-HNDP in aquo-organic solution THF:H₂O (4.26:1) buffered at pH 7.0 ([2,6-HNDP]= $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; λ_{exc} =475 nm)

➤ Effect of pH on sensor fluorescence

First, the effect of pH on the fluorescence intensity of the sensor was investigated, by recording the fluorescence spectra over a range of different pH values. pH values were adjusted by the addition of HCl and NaOH (pH titration) on the sensor solution (at $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ in THF:H₂O (9:1)). The emission intensity at 507 nm was plotted as a function of pH and this plot is shown in Figure S.28. These results illustrate that From pH 2–11 the fluorescence intensity remained relatively unchanged meaning 2,6-HNDP is effective over a broad pH range.

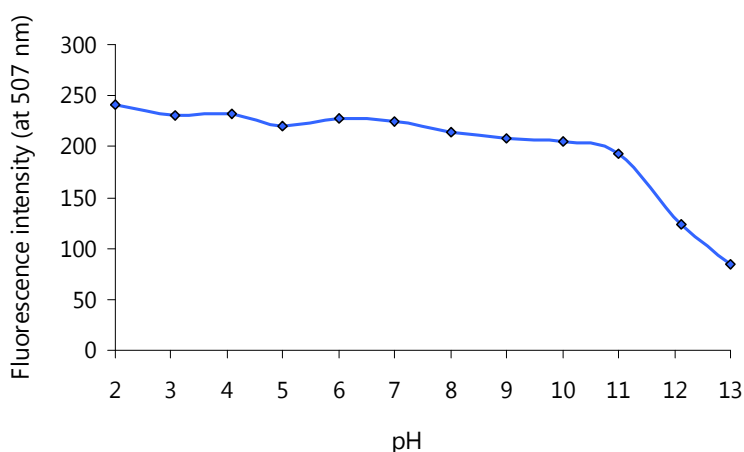


Figure S.28. Plot of fluorescence intensity against pH for 2,6-HNDP ([2,6-HNDP]= $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, solvent: THF:H₂O (9:1) buffered at pH 7.0; $\lambda_{\text{exc}}=475 \text{ nm}$)

➤ Study of the sensor 2,6-HNDP for the determination of metal ions

The selectivity of the sensor 2,6-HNDP was tested over a range of environmentally and biologically important metal ions, such as Li(I), Na(I), Mg(II), K(I), Ca(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Sr(II), Ag(I) and Ba(II). A volume of 10 mL of solution containing sensor and metal was prepared for each metal ion. In each volumetric flask was added: 1 mL of HEPES buffer (pH 7.0), 1 mL of sensor solution ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$ in THF:H₂O (9:1)) and 1 mL of metal aqueous solution ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). Finally, it was made up to volume with THF:H₂O (9:1) solvent. Final concentrations in aquo-organic solution THF:H₂O (2.57:1), were $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ of sensor and $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ of metal. UV-Vis spectra for these solutions are shown in Figure S.29A. Significant changes in the absorption spectrum of the sensor were observed upon the addition of Fe(III). As shown in the Figure S.29B, a significant blue shift from 475 nm to 325 nm was observed upon addition of $50 \mu\text{mol L}^{-1}$

of Fe(III) to a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ of sensor solution. This effect was so significant it could be observed by the naked eye with the solution changing from yellow to colourless.

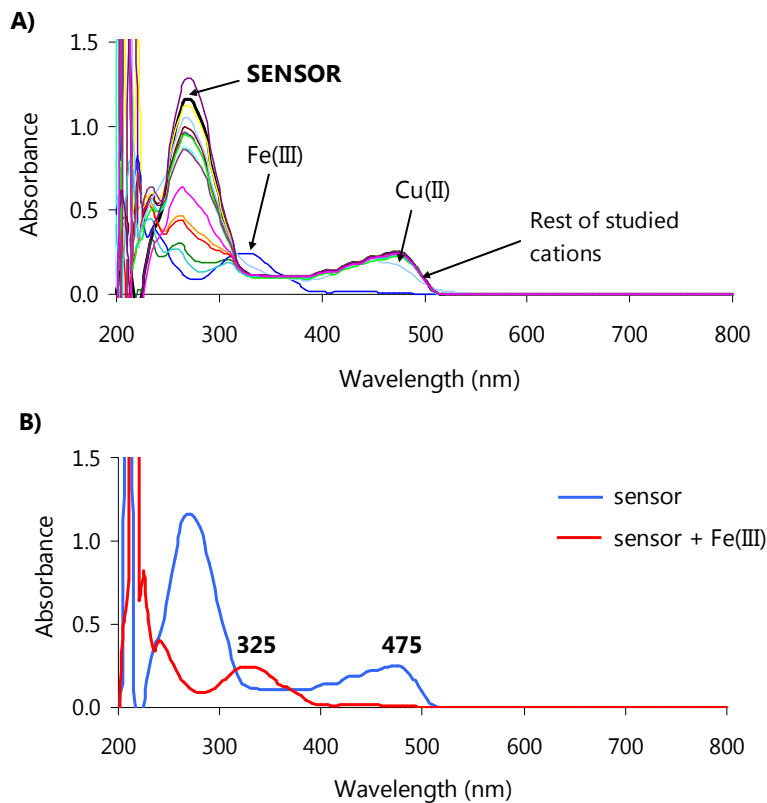


Figure S.29. A) UV-Vis spectra of 2,6-HNDP in absence and presence of metal ions (in THF:H₂O (2.57:1) buffered at 7.4 solution): Li, Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Sr, Ag, Ba and Pb ($[2,6\text{-HNDP}] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $[\text{Metal}] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$) ; **B)** UV-Vis spectrum for Fe(III)

The addition of the chosen metal ions caused practically no change to the initial fluorescence spectrum of 2,6-HNDP. However, the addition of Cu(II) and Fe(III) caused a noticeable decrease in the band at 507 nm (Figure S.30), higher for Fe(III) than Cu(II).

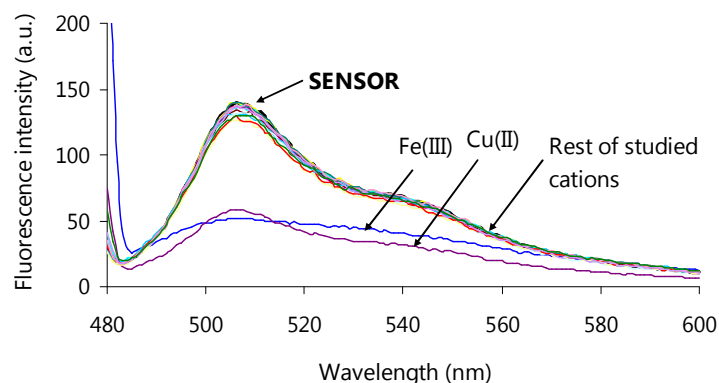


Figure S.30. Fluorescence spectra of 2,6-HNDP in absence and presence of metal ions (in THF:H₂O (2.57:1) buffered at 7.0 solution): Li, Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Sr, Ag, Ba and Pb ([2,6-HNDP]=10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and [Metal]=50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; λ_{exc} =475nm)

The quenching effect of Fe(III) and to a lesser extent Cu(II) is most likely due to electron transfer from these redox active metal ions to the excited state of 2,6-HNDP leading to non-radiative decay of the excited state [Fabbriizzi and Poggi, 1995; Callan et al., 2005]. Due to the higher response of the sensor to Fe(III) over other tested cations, the system 2,6-HNDP-Fe(III) was studied.

➤ Stoichiometry studies for the complex 2,6-HNDP-Fe(III)

To determinate the binding stoichiometry of the complex formed by the sensor 2,6-HNDP and Fe (III), the mole ratio method (keeping metal constant) was employed for monitoring absorbance at 475 nm. The composition of the solutions employed in these studies is shown in Table S.13.

As shown in Figure S.31, the absorbance at 475 nm remained low until one molar equivalent of 2,6-HNDP was added to the Fe(III) solution, after which the absorbance increased significantly. This suggests as sensor is added to a fix solution of Fe(III) it forms a 2,6-HNDP-Fe(III) 1:1 complex which gives rise to the absorption band with λ_{max} 325 nm. However, after one molar equivalent of sensor has been added, the excess remains unbound in solution giving rise to the absorption band with 475 nm (i.e. the λ_{max} of 2,6-HNDP).

Table S.13. Composition of the different solutions of 2-HNPT and Fe(III) used for stoichiometry studies (mole ratio method) in THF:H₂O (2.57:1) medium

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sol. A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sol. B	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Sol. C	0	0.2	0.4	0.6	1	-	-	-	-	-
Sol. D	-	-	-	-	-	0.7	0.9	1.1	1.3	1.5
H ₂ O	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
M _{ratio}	0	0.2	0.4	0.6	1	1.4	1.8	2.2	2.6	3
Abs (at 475 nm)	0.008	0.027	0.014	0.017	0.017	0.043	0.104	0.203	0.440	0.735

Final volume of the solution: 10 mL (make up to volume with THF:H₂O 9:1)

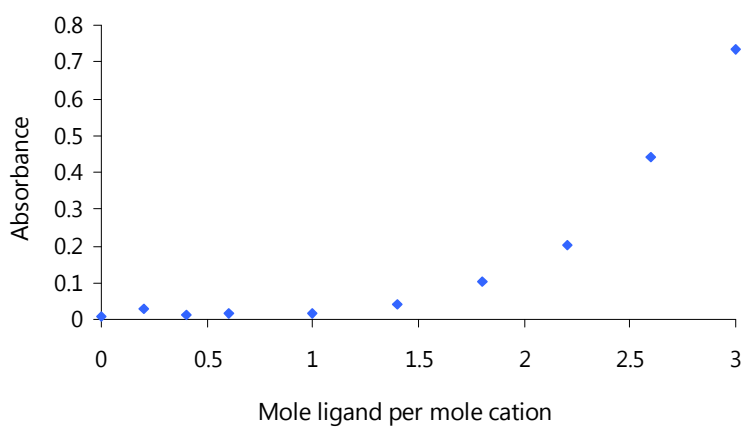
M_{ratio}: molar ratio: moles of 2,6-HNDP/mol of Fe(III)

Sol. A: mL of HEPES buffer at pH 7.0

Sol. B: mL of aqueous solution of Fe(III) $1.5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Sol. C: mL of 2,6-HNDP solution in THF:H₂O (9:1) $0.75 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Sol. D: mL of 2,6-HNDP solution in THF:H₂O (9:1) $1.5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

**Figure S.31.** Stoichiometry studies for 2,6-HNDP-Fe(III) complex using mole ratio method (keeping constant [Fe(III)]). (Conditions: Table S.13)

➤ Applicability range of the sensor 2,6-HNDP for the determination of Fe(III) in solution

The linear dynamic range of the proposed method was calculated by addition of increasing amount of Fe(III) to a 2,6-HNDP solution (keeping constant this concentration). Different solutions were prepared as follows (in a total volume of 10 mL): 1 mL of HEPES buffer at pH 7.0 (to control de solution pH value), 1 mL of sensor solution (prepared at $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ in THF:H₂O (9:1)) and gradually increase concentrations of metal. Finally, it was made up to volume with THF:H₂O (9:1) solvent, obtaining a final aquo-organic medium composed by THF:H₂O (2.57:1) in every solution. Upon the gradually increase concentration of Fe(III) added to a solution of the sensor, a concentration dependent reduction in the intensity at 507 nm was observed, as it shown in Figure S.32.

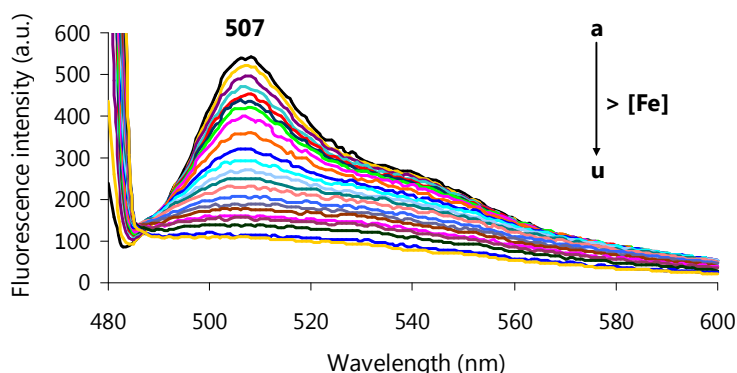


Figure S.32. Fluorescence emission spectra of 2,6-HNDP in aquo-organic solution THF:H₂O (2.57:1) buffered at pH 7.0. Conditions: [2,6-HNDP]= $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; [Fe(III)] ($\mu\text{mol L}^{-1}$): (a) 0; (b) 20; (c) 40; (d) 55; (e) 60; (f) 65; (g) 70; (h) 80; (i) 90; (j) 100; (k) 110; (l) 120; (m) 130; (n) 140; (ñ) 150; (o) 160; (p) 170; (q) 180; (r) 190; (s) 200; (t) 208; (u) 213; $\lambda_{\text{exc}}=475 \text{ nm}$

The fluorescence quenching data were analyzed by the *Stern-Volmer relationship*, which is given by the following equation:

$$I_0 / I = 1 + K_{SV} [Q];$$

where F and F_0 are the fluorescence intensities of the reagent in the presence and absence of Fe(III) ion, respectively. $[Q]$ is the copper ion concentration (quencher) and

K_{SV} is the Stern-Volmer quenching constant. If the system follows the Stern-Volmer relationship, the plot of F_0/F versus $[Q]$ should be linear and the quenching mechanism would be mainly due to the dynamic process, where the diffusion process is the dominant one. However, a non-linear plot with a positive deviation was obtained as it can be seen in Figure S.33. In this case, the quenching was not purely collisional and this finding may be due to the formation of the ground state complex or static quenching process [Lakowicz, 2006].

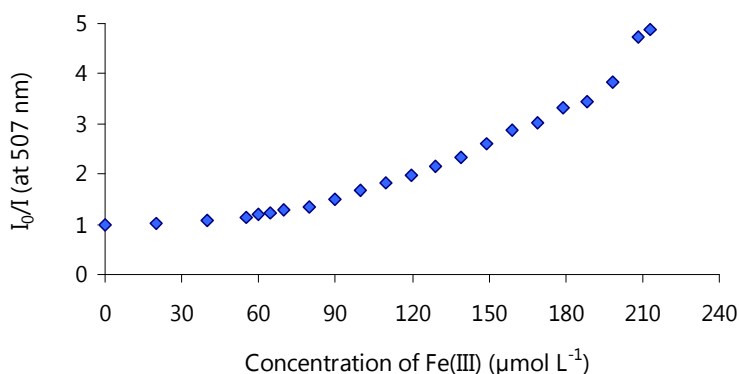


Figure S.33. Stern-Volmer plot of 2,6-HNDP with increasing concentrations of Fe(III) ions

In order to linearize the non-linearity of response, a *modified Stern-Volmer relationship* was employed. In this case, the static quenching is explained by introducing an additional factor C in the linear Stern-Volmer equation [1] and using the logarithmic form of the equation [2]:

$$I_0 / I = (1 + K_{SV} [Q]) / C \quad [1]$$

$$\log(I_0 / I) = K_{SV} [Q] + C \quad [2]$$

The modified Stern-Volmer plot of $\log(I_0/I)$ versus $[Q]$ showed a good linear relationship ($R^2=0.995$) in the studied range from 55 to 213 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of iron ion solutions as shown in Figure S.34. The terms K_{SV} and C were evaluated from the slope and intercept of the calibration plot, obtaining $3.9 \times 10^3 (\text{mol L}^{-1})^{-1}$ and -0.164 , respectively.

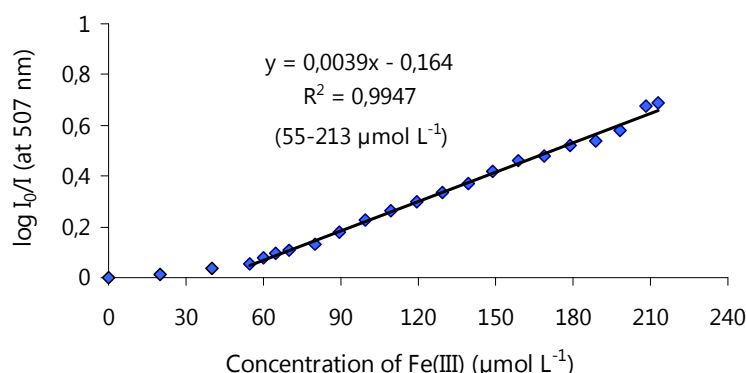


Figure S.34. Modified Stern-Volmer plot of 2,6-HNDP with increasing concentrations of Fe(III) ions

To obtain the binding constant ($\log\beta$) of the ligand-metal complex, the Henderson-Hasselbalch equation was used, which was employed to get the pK_a value, but in this occasion the term $-pH$ is replaced by $-\log[\text{cation}]$ and pK_a by $\log\beta$ [de Silva and Gunaratne, 1990; de Silva et al., 1995]. With these changes, the final expression is:

$$\log(I_{\max} - I) / (I - I_{\min}) = -\log[\text{cation}] + \log\beta$$

where I_{\max} is the maximum fluorescence intensity, I_{\min} the minimum fluorescence intensity and I the measured fluorescence intensity obtained after each iron addition. Based on a 1:1 binding stoichiometry the binding constant was calculated to be 4.01 (value obtained by dividing the intercept value by the slope).

➤ Selectivity studies

Finally, the effect of different metal ions (Li(I), Na(I), Mg(II), K(I), Ca(II), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Sr(II), Ag(I), Ba(II) and Pb(II)) was evaluated comparing the changes caused fluorescence intensity in relation to the initial intensity of the sensor. Different solutions were prepared for each metal ion with a final concentration of $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ for 2,6-HNDP and $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ for cation in a medium composed by THF:H₂O (2.57:1) buffered at 7.0 with HEPES solution. In Figure S.35 are plotted I/I_0 ratios in each study, where I is the intensity of the solution after the metal addition and I_0 is the initial fluorescence intensity of 2,6-HNDP (without metal addition) at 507nm. When a plot of relative intensity I/I_0 at this wavelength was represented for each metal ion, a significant

quench (90%) of the original emission intensity was observed for Fe(III) and a much smaller quench (50%) was observed for Cu(II).

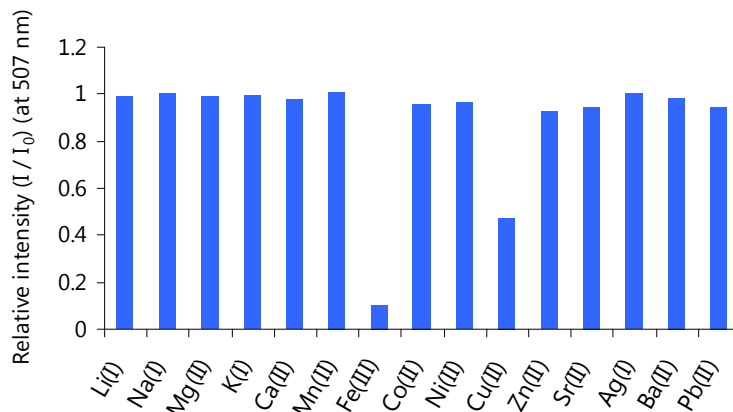


Figure S.35. Bar chart illustrating the selectivity of 2,6-HNDP against a range of metal ions in THF:H₂O (2.57:1) buffered at pH 7.0. Conditions: [2,6-HNDP]=10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Metal]=50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; λ_{exc} =475 nm

Due to Cu(II) ion also caused a noticeable quench in the fluorescence intensity when it reacted with the sensor, it was evaluated if the presence of these ions could affect Fe(III) measurements. To that end, several solutions of sensor with Fe(III) and Cu(II) within the applicability range obtained for Fe(III) were prepared. These concentrations were: 50, 70, 100, 120, 150, 170 and 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in THH:H₂O (2.57:1) (Solutions 1-7 in Table S.14) prepared from a initial aqueous solution of 2 mmol L⁻¹. Similarly, solutions containing Fe(III) with Cu(II) were prepared.

Table S.14. Volume composition for the preparation of solutions of Fe(III) and Fe(III)+Cu(II) used to study Cu(II) effect in the fluorescence determination of Fe(III) ions

Sample	1	2	3	4	5	6	7
Sol. A	1	1	1	1	1	1	1
Sol. B	1	1	1	1	1	1	1
Sol. C or D	0.25	0.35	0.50	0.60	0.75	0.85	1
H ₂ O	0.75	0.65	0.50	0.40	0.25	0.15	0

Final volume of the solution: 10 mL (make up to volume with THF:H₂O 9:1)

Sol. A: mL of HEPES buffer at pH 7.0

Sol. B: mL of 2,6-HNDP solution in THF:H₂O (9:1) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$

Sol. C: mL of aqueous solution of Fe(III) 2 mmol L⁻¹

Sol. D: mL of aqueous solution of Fe(III) and Cu(II) 2 mmol L⁻¹

After fluorescence measurements at 507 nm, results were plotted against metal concentrations in Figure S.36. It can be confirmed that is feasible to determine Fe(III) ions in aquo-organic solution in the presence of equimolar concentrations of Cu(II) within the studied range.

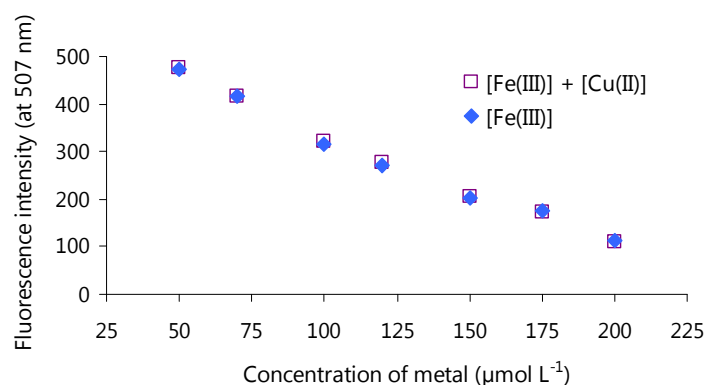


Figure S.36. Fluorescence intensity of 2,6-HNDP in aquo-organic solution THF:H₂O (2.57:1) at pH 7.0 in the presence of Fe (III) and Fe(III)+Cu(II) equimolar mixture. Conditions: Table S.14

Conclusions

Two Schiff bases (characterised for presenting an imine group in their chemical structures) have been successfully synthesised, characterised and applied for a sensitivity and selectivity Fe(III) determination in aquo-organic (THF:H₂O) solution. First compound (2-hydroxynaphthaldehyde-N-phenylthiosemicarbazone, 2-HNPT) consisted in an 'Off-On' ratiometric fluorescence sensor. This compound displayed good selectivity for Fe(III) when tested against a range of physiological and environmentally important ions and was sensitive in the 15-37.5 μmol L⁻¹ range. The fluorescence enhancement upon binding Fe(III) was attributed to a cancellation of the C=N isomerisation that otherwise leads to non-radiative decay of the excited state. The binding stoichiometry was confirmed as 1:1 (2-HNPT-Fe(III)) and the binding constant logβ was determined as 4.56. The second fluorescent reagent (2,6-bis(N-(2-hydroxy-1-naphthylmethylene)-diamino)pyridine, 2,6-HNDP) has also been developed for the recognition of Fe(III) in semi-aqueous solution at pH 7.0. The sensor, containing two Schiff base type receptors directly connected to naphthalene fluorophores, shows a concentration dependent decrease in emission intensity upon Fe(III) addition. The

sensor was selective for Fe(III) over other metal ions and can measure Fe(III) ion concentration between 55 and 213 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The binding stoichiometry was established as 1:1 (host: guest) with a binding constant ($\log\beta$) of 4.01. Furthermore, the addition of Fe(III) to a solution of 2,6-HNDP caused a colour change from light yellow to colourless meaning the sensor is also capable of detecting Fe(III) by the naked eye.

Supplementary information

This chapter was carried out in the laboratories of the Department of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (University of Ulster, Coleraine, Northern Ireland, UK) under the supervision of Professor Dr. John F. Callan.

Materials and Reagents

Reagents *2-hydroxy-1-naphthaldehyde*, *4-phenylthiosemicarbazide* and *2,6-diaminopyridine* were of the highest grade obtainable and were purchased from Sigma-Aldrich.

Metal ions solutions were prepared from their chloride salts, purchased from Sigma-Aldrich (analytical grade chemicals).

UV and Fluorescence Spectroscopy

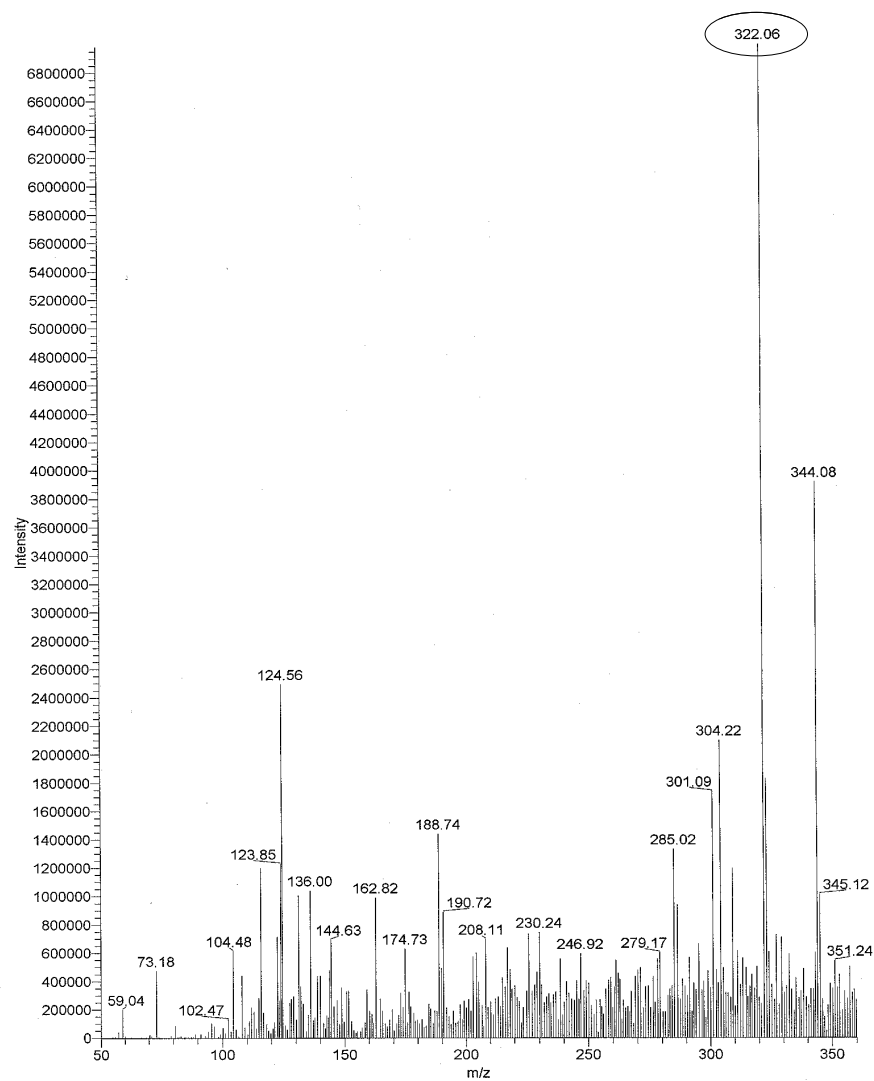
Absorbance measurements were recorded on a *Varian Cary 50 Spectrometer* using 10 mm quartz cuvettes. Fluorescence measurements were recorded on a *Cary Eclipse Fluorimeter* using 10 mm quartz cuvettes. Excitation slit size was 10 nm and emission slit size was 10 nm. Scan speed was set at 500.

NMR Spectroscopy

NMR spectra were recorded on a Varian 500 MHz spectrometer.

Mass Spectrometry

ESI-MS characterisation of 2-HNPT and 2,6-HNDP was achieved using a *LCQTM quadrupole ion-trap mass spectrometer* (Finnigan MAT, San Jose, California, USA) utilising electrospray ionisation (ESI).

Synthesis spectra**Figure a.** Low Resolution positive ESMS of 2-HNPT

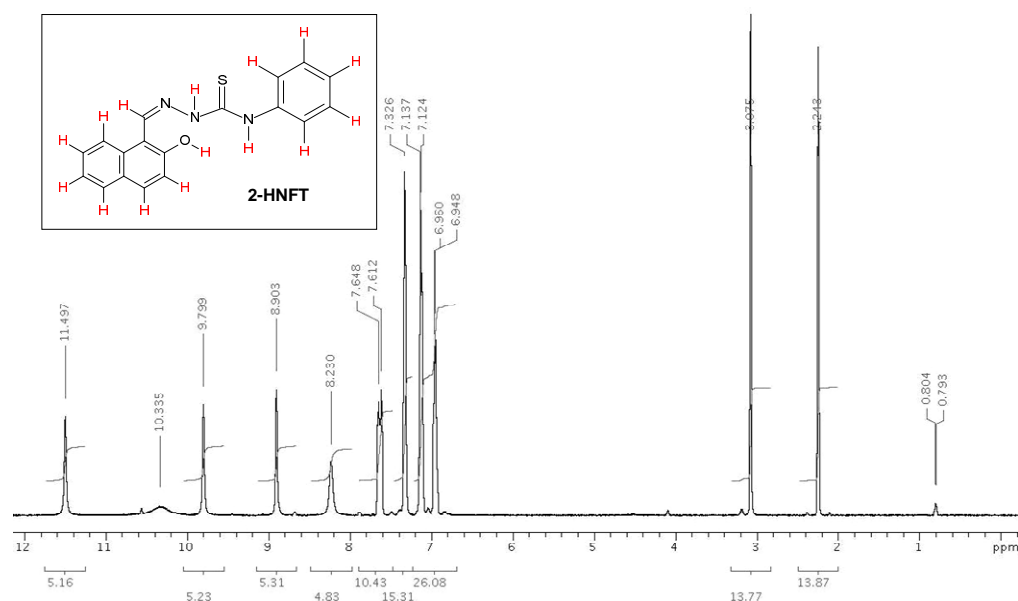


Figure b. ^1H -NMR spectrum of 2-HNPT recorded in DMSO

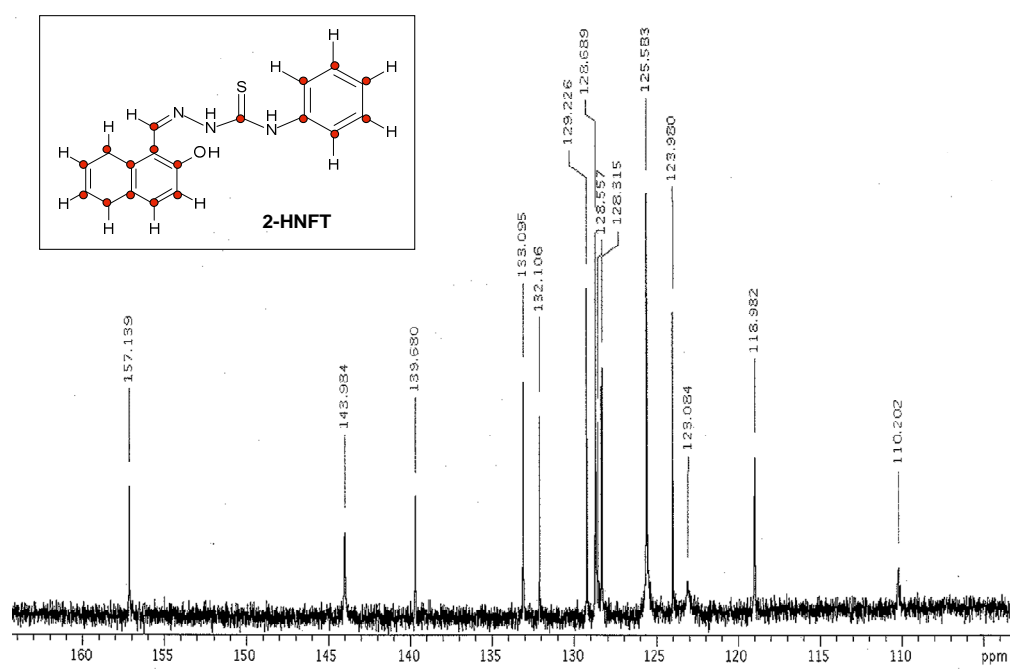


Figure c. ^{13}C -NMR spectrum of 2-HNPT recorded in DMSO

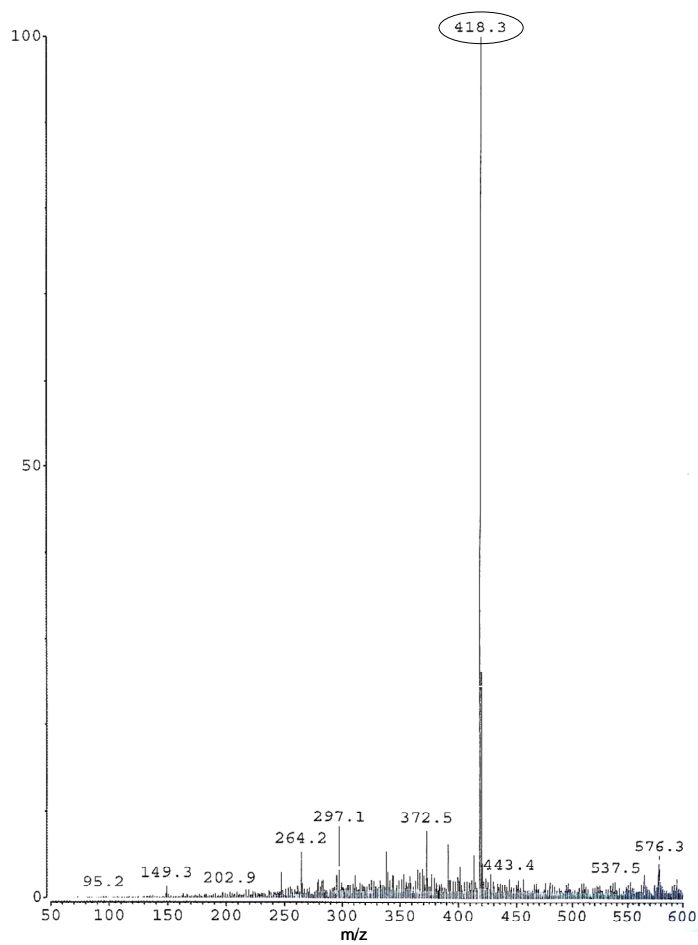


Figure d. Low Resolution positive ESMS of 2,6-HNDP

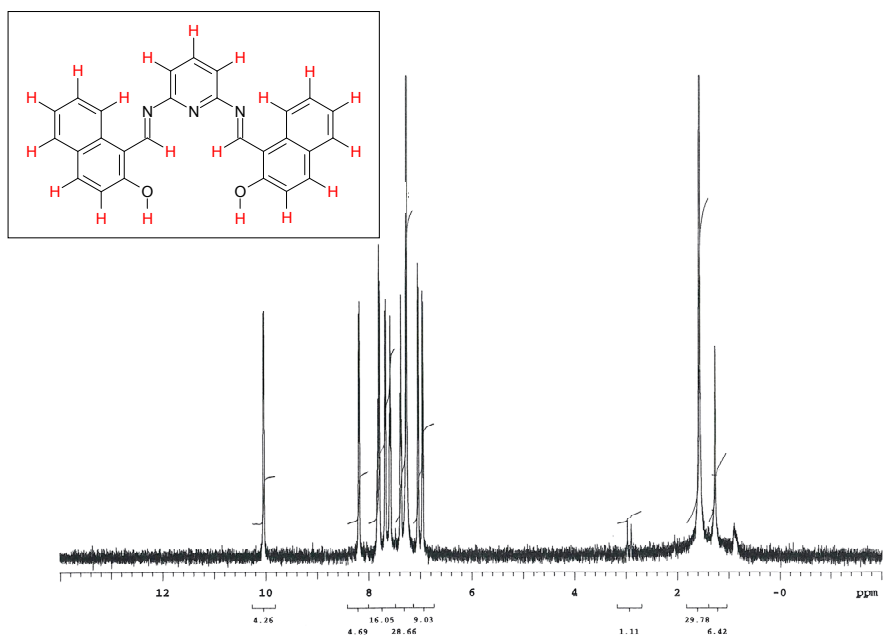


Figure e. ^1H -NMR spectrum of 2,6-HNDP recorded in DMSO.

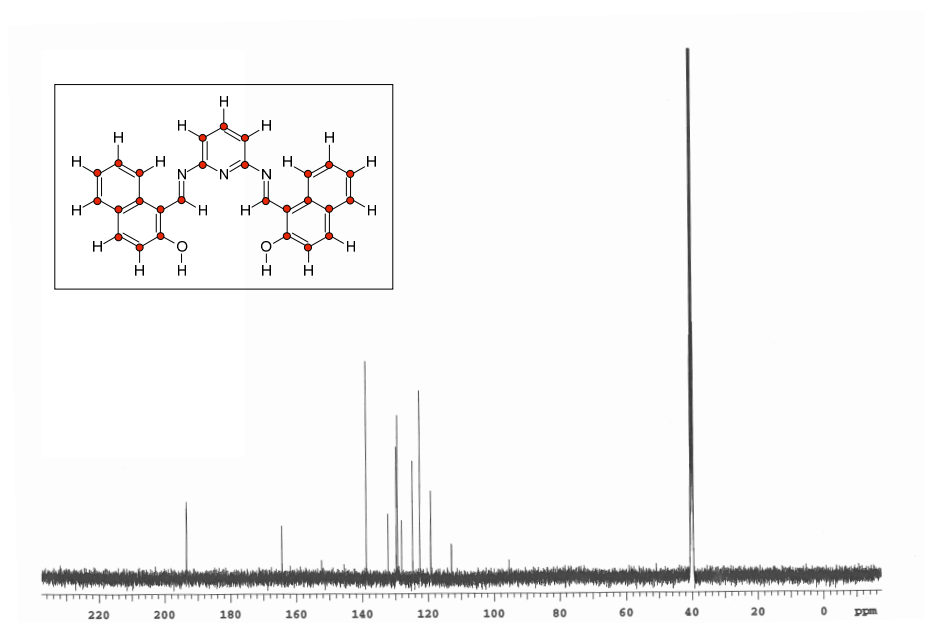


Figure f. ^{13}C -NMR spectrum of 2,6-HNDP recorded in DMSO

Chapter IV

Assessment of the metal pollution in Algeciras Bay

Trace metals released into aquatic environments through various anthropogenic activities can cause serious problems in flora, fauna and human beings, because they exhibit bioaccumulation, non-biodegradable properties and toxicity even at low concentrations [Hua et al., 2012]. Industrial activities, urbanization, coastal development, recreation and tourism, wastewaters treatment facilities and maritime traffic have been important sources of marine pollution. Consequentially, estuarine and coastal bays, which are regions of active land-sea interaction, respond sensitively to natural processes and anthropogenic activities [Alonso-Castillo et al., 2013].

Adsorption to solid phases is considered to be a very important process that controls the fate and behaviour of trace metals in natural aquatic environments. Suspended particulate matter (SPM), deposited sediment (DS) and natural surface coatings (NSC) are solids commonly encountered in natural aquatic systems that have important effects on pollutants. Immobilization mechanisms include adsorption onto soil/sediments by ion exchange, coagulation with dissolved or suspended species in water (e.g., organic matter), incorporation into the lattice structure of minerals, and precipitation by forming insoluble species of heavy metals. Thus, sediments are the main repository and source of heavy metals in the aquatic environment and play an important role in the transport and storage of potentially hazardous metals. Nonetheless, studies on the water column are also necessary [Hua et al., 2012; Alonso-Castillo et al., 2013; Lin et al., 2013; Mansour et al., 2013].

Additionally, fishes are good indicators assessing the trace metals pollution and potential risk of human consumption. Fish living in polluted waters may accumulate toxic trace metals via the food chains to levels that may affect human health [Schenone et al., 2014].

The aim of this work was to evaluate the metallic levels of Zn, Cd, Pb and Cu and its distribution in different compartments of aquatic environment in Algeciras Bay. For this purpose, heavy metal concentrations were measured in water, sediments and tissues (gill, liver and muscle) of four fish species (*Solea senegalensis* (Kaup, 1858), *Trigloporus lastoviza* (Bonnaterre, 1788), *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) and *Diplodus sargus sargus* (Linnaeus, 1758). The first fish specie shows a benthic behaviour, and the rest of them have demersal behaviour. The selection of these species was decisively for a satisfactory study where results were associated to each sampling point.

Algeciras Bay (Figure S.37) is an important industrial area located on the southwestern Spanish coast (36°11'0''N; 5°26'45''W) [Morillo et al, 2007]. Covering an area of about 9 x 11 km, and with maximum depth of nearly 400 m, features by far the mildest surface currents of the strait. This circumstance has made this spot the preferred location in the zone for the settlement of harbours from early civilizations. Today, the bay holds two important ports in both Algeciras and Gibraltar, and also numerous industrial plants distributed all along its shoreline [Sánchez-Garrido et al., 2014]. There are a significant number of industries around the coast of Algeciras Bay, including stainless steel manufacturing plant, petrochemical and petroleum refineries, paper mills, thermal power plants, ironworks, shipyards, piers and breakwaters [Morillo et al., 2007; Morillo and Usero, 2008; Periañez, 2012]. Apart from that, large amounts of pollutants are discharged into the bay from major population centres such as the cities of Algeciras, Los Barrios, San Roque, Linea de la Concepcion and Gibraltar receiving heavy urban sewage. The bay also receives the water discharge of Guadarranque and Palmones rivers. The bay water has high turnover because of its proximity to the Strait of Gibraltar, where Mediterranean Sea and the Atlantic Ocean meet with strong currents. These geographical conditions could disperse the pollutants in the water [Morillo et al., 2007]. Nevertheless, marine pollution is a realistic risk and a major problem in the area.

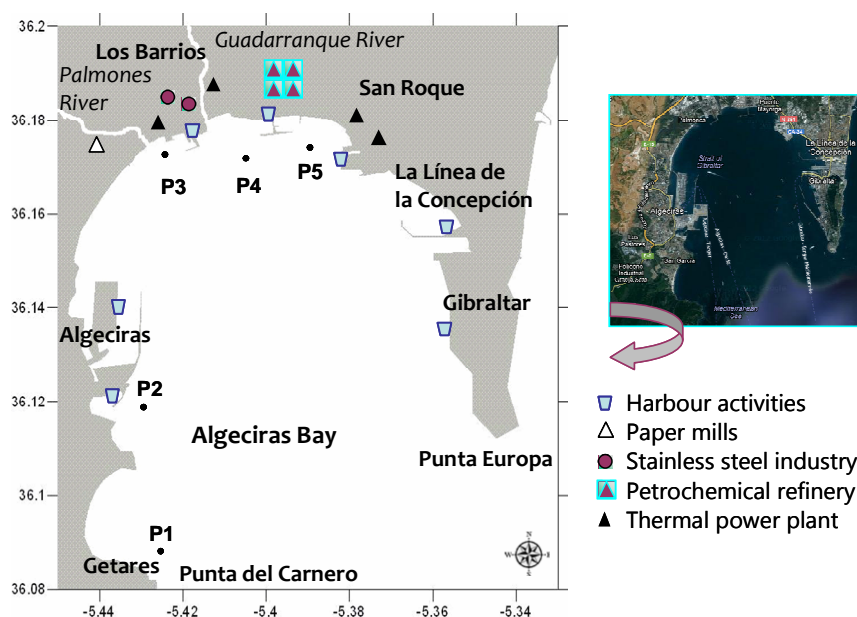


Figure S.37. Map of Algeciras Bay showing the sampling sites and the principal anthropogenic activities in the area

Sampling points selection

Samples of water, sediments and fish were collected for total and extensive speciation studies in October 2007, May 2008, November 2008 and May 2009 from site P1 (*Getares beach*, a control site with scarce urban influence) and the four pollution hotspots at sites P2 (*Isla Verde*, with urban influence), P3 (*Palmones*, area characterised by the presence of Palmones river, urban influences, Acerinox steel manufacturing plant and a thermal power plant), P4 (*Guadarranque*, with the Cepsa oil refineries, river and urban influences) and P5 (*Puente Mayorga*, possibly influence by power thermal plants in the area) (Table S.15). Besides, all sampling points may be affected by harbour activities.

Table S.15. Sampling points, main characteristics and coordinates

Sampling point	Code	Main characteristics of the area	Coordinates	
			North	West
Getares Beach	1	Control	36° 05' 28.31''	5° 26' 10.93''
Isla Verde	2	Urban influence	36° 07' 8.43''	5° 25' 37.60''
Palmones	3	Acerinox, thermal power plant, river and urban influences	36° 10' 19.51''	5° 25' 27.14''
Guadarranque	4	Refineries, thermal power plant, river and urban influences	36° 10' 32.21''	5° 24' 27.47''
Puente Mayorga	5	Refineries, harbour activities	36° 10' 32.23''	5° 23' 23.24''

Methodology

➤ Water collection and analysis

Water samples were taken from a boat using a peristaltic bomb (Masterflex 07571-05 popped head 07518-02, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois, USA), rigid Teflon pipes and flexible Tygon tubing (6406-66). Water samples were placed into low-density polyethylene bottles, which were pre-cleaned with 3 mol L⁻¹ and rinsed with Milli-Q deionised water (Millipore, USA) six times, and stored in polyethylene bags until required. For dissolved metal contents, water samples were filtered *in situ* using 0.45 µm Whatman groundwater filter capsule (29705-92, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois, USA) connected online with the Tygon tubes. Besides, non filtered samples were collected for total metal analysis. Several water samples were collected in each sample point in order to study distribution of heavy metal content in water, based on metal (Zn, Cd, Pb, Cu) pH speciation.

General fractionation scheme is shown in Figure S.38. For this purpose, samples (500 mL) for total metal and total dissolved metal determinations were acidified with HNO₃ (Suprapur grade) in the laboratory (to obtain a final acid concentration of 2 ml L⁻¹ in the sample), kept to room temperature during 1 week and, afterwards, stored at -20 °C until analysis. With the aim of determining the different dissolved metal fractions according to the scheme, a filtered sample (500 mL) at natural pH for determining labile content was stored at -20 °C immediately after sampling and other filtered sample (500 mL) was conditioned at pH 4.7 and stored at -20°C until analysis, in order to study the moderately labile fraction. To obtain this pH value, 10 mL of 3 mol L⁻¹ acetate buffer (pH 4.7) was added to water sample. 500 mL more of non-filtered water

were collected for density and suspended matter determinations. Also, 500 mL of filtered water and acidified with HCl (Suprapur grade) (2 ml L^{-1}) was employed to analyse the content of dissolved organic carbon (DOC).

Firstly, total and dissolved metal content were measured by Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry (DPASV) after an acid digestion. To conduct the digestion, 45 mL of sample with 0.2 mL of 65% HNO_3 and 0.125 mL HClO_4 (Suprapur grade) were digested in a closed Teflon reactor (PTFE, 100 mL, BRAND, 1305 38, Weirtheim, Germany) for 8 h at 120°C , cooled and diluted with Milli-Q deionised water up to 50 mL in a volumetric flask. Due to the low concentrations obtained in dissolved metal analysis, dissolved speciation (labile and moderately labile fraction) was not performed. Thus, our speciation studies included only total, dissolved and particulate metal contents. Particulate contents were calculated by difference between total and dissolved concentrations (Fraction F6 in Figure S.38).

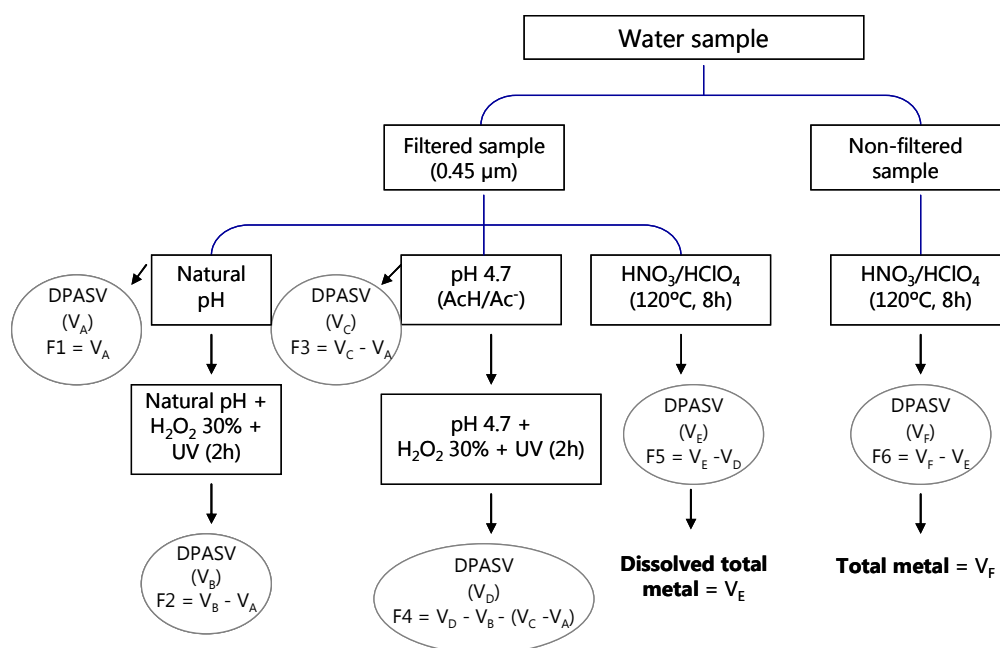


Figure S.38. Scheme of chemical fractionation based on pH changes for metal analysis in water samples (F1: labile inorganic metal; F2: labile organic metal; F3: moderately labile inorganic metal; F4: moderately labile organic metal; F5: inert fraction metal; F6: particulate metal)

In all cases, blanks were measured using Milli-Q ultrapure water, following the same protocol for each phase of speciation scheme (total and dissolved content). The quality of Zn, Cd, Pb and Cu analysis method in was checked using a certified reference water of the Community Bureau of Reference: *BCR-CRM505* (estuarine water acidified to pH 1.6).

Sample handling and preparation of solutions were carried out using acid cleaned material, wearing polyethylene gloves and working under laminar flow cabinet.

Temperature, pH, salinity and dissolved oxygen of water were measured *in situ* utilising an electrochemical hand-held device. Suspended solids (SS) were gravimetrically quantified by using 0.45 µm nylon filters (Osmonics, USA) and dissolved organic carbon was evaluated in different samples that those for metal analysis and using TOC analyzer.

➤ Sediments collection and analysis

Surface sediment samples were collected from the seabed (2-20 cm) using an Eckman-Birdge dredger and were place immediately in polyethylene bags. In the laboratory, sediment samples were stored at -20°C until analysis. Before determinations, samples were dried at 105 °C during 24 hours, grinded using and agate mortar, sieved through a stainless steel mesh in order to obtain fine particle-size fractions and stored in polyethylene bottles until sequential extraction analysis.

Previous sediment studies (17 sample points) were based in the assessment of the most labile metal fraction, by means of two simple extractions: 1) 0.005 mol L⁻¹ DTPA + 0.01 mol L⁻¹ CaCl₂ + 0.1 mol L⁻¹ triethanolamine (TEA) [Lindsay and Norvell, 1978] and 2) 0.11 mol L⁻¹ acetic acid (identical to first step of BCR extraction procedure).

Sediment speciation studies (5 sample points) were based on the extended 3-step BCR extraction procedure, described by Davidson et al. [Davidson et al., 1999]. In the first step, an initial amount of sediment (1 g) was mechanically shaken for 16 hours (frequency 150/min) with 40 mL 0.11 mol L⁻¹ acetic acid and the extract (acid soluble-extractable fraction) was separated by centrifugation. In the second step, residue from previous step, was shaken for 16 h with 40 mL 0.1 mol L⁻¹ NH₂OH·HCl adjusted to pH 1.5 with HNO₃ and the extract (reducible fraction) was separated by centrifugation. In the third step, the residue was twice digested for 1 h with 10 mL of 8.8 mol L⁻¹ H₂O₂ (Suprapur grade) and then heated at 85 °C for one more hour. Finally, it was extracted with 50 mL 1.0 mL CH₃COONH₄ (adjusted to pH 2 with nitric acid), shaking it for 16 h, and separated by centrifugation (oxidisable fraction). The final residual fraction was twice heated by IR lamp with 5 mL HF 48% (Suprapur grade) in a Teflon Petri dish until

dryness (fourth step). This procedure was repeated twice with 5 mL HNO_3 65% (Suprapur grade) and the residue was lixiviated with 20 mL of 3.86 mol L^{-1} HCl by heating under magnetic agitation during 1 hour. A brief summary of all steps is shown in Table S.16.

Total acid digestions of all sediments were performed using the same procedure employed with the residual fraction. The extracts collected after sequential extraction steps and in the total acid digestions were made up to 25 and 50 mL, respectively. All this liquid phases were stored in the fridge at 4°C inside acid washed polyethylene bottles until they were analysed by Inductively Couple Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS). In all cases, respective blank samples were prepared and taken into account.

Table S.16. The BCR scheme used for operational speciation of metals.

Step	Sediment fraction	Extractant	Conditions
F1	Water soluble, exchangeable or bound to carbonates	40 mL 0.11 mol L^{-1} CH_3COOH	Shake 16 h at RT ^a
F2	Reducible	40 mL 0.5 mol L^{-1} $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (pH 1.5)	Shake 16 h at RT
F3	Oxidizable	10 mL 8.8 mol L^{-1} H_2O_2 (twice)	Shake 1 h at RT and 1 h at 85°C
		50 mL 1 mol L^{-1} $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 2)	Shake 16 h at RT
F4	Residual	5 mL 48% HF (twice)	Heat until dryness
		5 mL 65% HNO_3 (twice)	Heat until dryness
		20 mL 3.86 mol L^{-1} HCl	Heat and stir 1 h

^aRT: room temperature

The viability of total digestion method used for sediment analysis was checked by using a sediment standard reference material of the National Institute of Standard & Technology (NIST): *NIST-SRM 1646a* (estuarine sediment), yielded good accuracy of analysis (83.2-101.4%, $n=5$). Standard sediment reference material *BCR-701* was employed to ensure the reliability of the BCR sequential extraction method for Zn, Cd, Pb and Cu, giving very good recoveries (76.8-117.0%, $n=4$). However, no reference material was available for DTPA extraction, but good recoveries ranging from 85-105% were obtained from a spiked sample, indicating the accuracy of this method for the mobile metal fraction analysis.

➤ Fish collection and analysis

Fish species (*Solea senegalensis*, *Trigloporus lastoviza*, *Scorpaena porcus* and *Diplodus sargus sargus*) were caught at sampling sites. Fishes were dissected right there and tissue subsamples (gills, liver and muscle) were taken out quickly. Fish tissues were transported to the laboratory into nitrogen liquid and stored at -80 °C. Before determinations, samples were freeze-dried and digested by microwave heating. Gills and muscle samples (0.1-0.3 g) were digested with 7 mL HNO₃ 65% (Suprapur grade), and liver samples (0.1-0.3 g), that had higher organic matter content, were digested with 4 mL of 65% HNO₃ and 2 mL of 30% H₂O₂ (Suprapur grade). After microwave digestion, samples were diluted with Milli-Q ultrapure water up to 25 mL in a volumetric flask. These extracts of digested tissue samples were analysed by ICP-MS. Corresponding blanks were also performed following same procedure than samples and were analysed for all metals.

The reliability of the analytical methodology applied for metal content in fishes was satisfactorily evaluated by means of the analysis of two certified reference biological materials of the National Research Council Canada: *NRCC DOLT-3* (dogfish liver) and *NRCC DORM-2* (dogfish muscle), obtaining good recoveries in the range 92.9-103.5%.

Results and discussion

➤ Metal concentration in water

(a) *Total metal*

Physical-chemical parameters and total metal concentrations of water samples evaluating in all samplings at each sampling site are shown in Table S.17 and Figure S.39 respectively. Total metal concentration ranged between: Zn: 0.820-9.622 µg L⁻¹; Cd: <LD-0.096 µg L⁻¹; Pb: <LD-2.340 µg L⁻¹; Cu: <LD-1.605 µg L⁻¹. Therefore, total metal content ordered from highest to lowest was: [Zn] > [Pb] > [Cu] > [Cd], highlighting the low content of cadmium in waters (closer to its limit of detection by DPASV: 0.013 µg L⁻¹).

Table S.17. Parámetros físico-químicos medidos *in situ* en cada uno de los puntos de muestreo seleccionados en la Bahía de Algeciras

Sampling	Parameter	Sampling sites				
		1	2	3	4	5
1 October 2007	Temperature (°C)	21.2	22.1	20.1	21.3	21.0
	pH	8.34	8.27	8.25	8.24	7.03
	Salinity (‰)	35.6	35.5	37.2	35.2	34.4
	Dissolved O ₂ (mg L ⁻¹)	4.0	4.1	4.0	4.0	4.1
	DOC (mg L ⁻¹)	1.72	1.52	1.39	1.53	6.23
2 May 2008	Temperature (°C)	18.3	19.7	20.2	20.9	18.9
	pH	8.42	8.42	8.56	8.51	8.58
	Salinity (‰)	34.8	33.9	32.4	33.8	33.5
	Dissolved O ₂ (mg L ⁻¹)	6.6	7.0	6.9	6.9	6.9
	DOC (mg L ⁻¹)	0.41	0.59	0.67	0.72	0.56
3 November 2008	Temperature (°C)	14.9	15.9	15.4	15.3	14.3
	pH	7.98	8.03	8.06	8.04	8.07
	Salinity (‰)	32.9	32.8	32.2	31.2	32.4
	Dissolved O ₂ (mg L ⁻¹)	5.7	5.4	4.7	5.3	4.6
	DOC (mg L ⁻¹)	1.74	1.03	0.66	1.67	1.52
4 May 2009	Temperature (°C)	18.2	18.3	18.2	18.6	18.5
	pH	7.11	6.96	7.58	7.37	7.42
	Salinity (‰)	30.1	29.3	30.3	29.5	29.7
	Dissolved O ₂ (mg L ⁻¹)	7.5	7.2	7.9	7.5	7.7
	DOC (mg L ⁻¹)	0.92	2.51	0.41	1.05	1.14

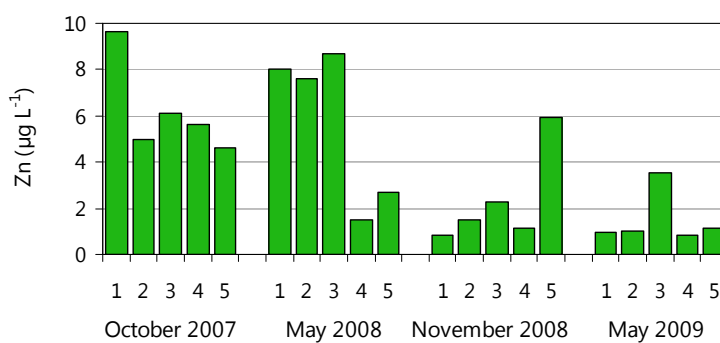


Figure S.39. Zn total concentration in water samples at the 5 sampling sites

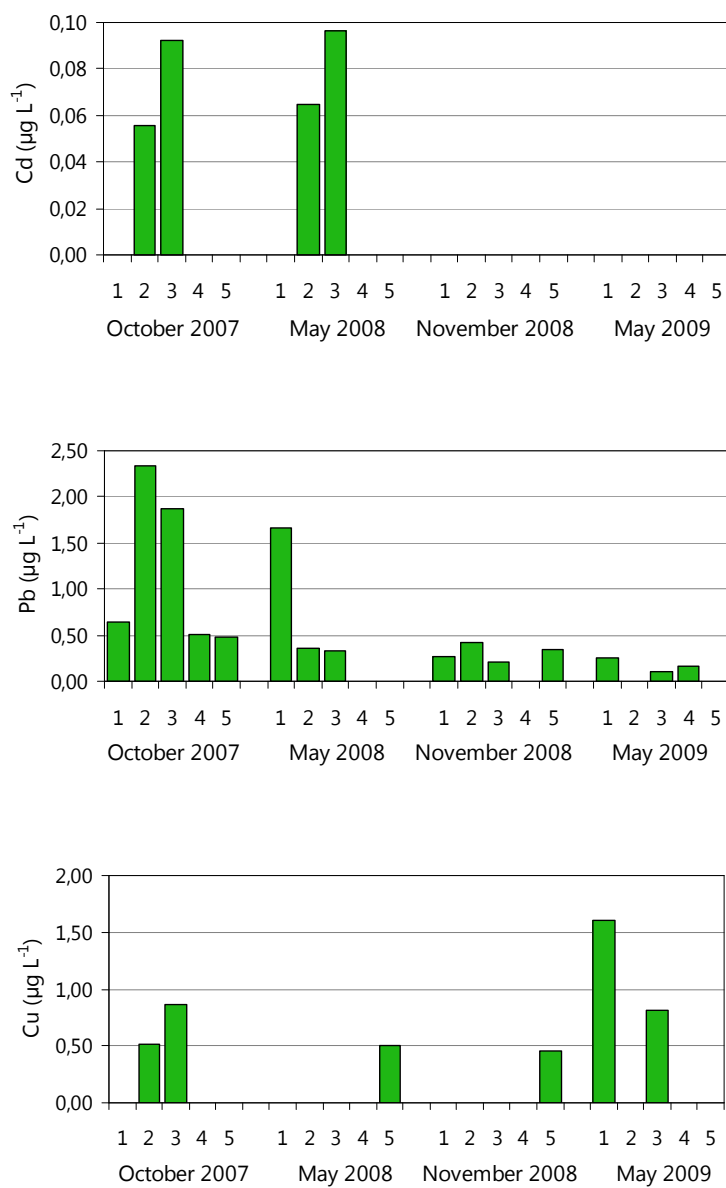


Figure S.39 (cont). Cd, Pb and Cu total concentration in water samples at the 5 sampling sites

- The average of Zn total concentration in every sampling was $6.193 \mu\text{g L}^{-1}$, $5.702 \mu\text{g L}^{-1}$, $2.273 \mu\text{g L}^{-1}$ and $1.493 \mu\text{g L}^{-1}$, being higher in October 2007 and May 2008. This trend can not be associated to seasonal behaviour. The site of Getares beach, initially selected as the control site, presented high concentration of total Zn in the first sampling, most likely because of a fuel spill from "Sierra Nava" vessel in January 2007 in this area. In general, Palmones site also presented high concentration compared to the other sites, probably due to the presence of the Acerinox stainless steel industry, Cepsa oil refineries and the Palmones estuary. One exception was Puente Mayorga site in November 2008, most likely due to an occasional spillage.

- In the case of Cd, majority of analysis was below the limit of detection of the technique DPASV, so cadmium total content could not be determined. Only low concentrations ($<0.10 \mu\text{g L}^{-1}$) were detected in Isla Verde and Palmones in samplings 1 and 2 (October 2007 and May 2008).

- Pb concentrations were $<2.50 \mu\text{g L}^{-1}$ in all sites, being maximum in Isla Verde at first sampling ($2.340 \mu\text{g L}^{-1}$). Results trend is probably due to specific spillages in this area affected by municipal wastes, which seem to be spread over time regarding low concentrations observed in the last samplings.

- In general, concentrations of total Cu were fairly heterogeneous, being no detected at Guadarranque site in any of the samplings. Cu concentrations at Getares beach and Palmones sites were most likely caused by occasional spills, industrial wastes or maritime activities.

(b) Dissolved and particulate metal distribution

The scheme of metal speciation in water (shown in Figure S.38) allowed performing a first fractionation between dissolved and particulate metal, considering the last fraction as less available. Since dissolved content in waters was low, further speciation studies into dissolved fraction (labile, moderately labile and inert) can not be carried out. Distributions of dissolved and particulate metals in percentage, obtained in this study, are shown in Figure S.40.

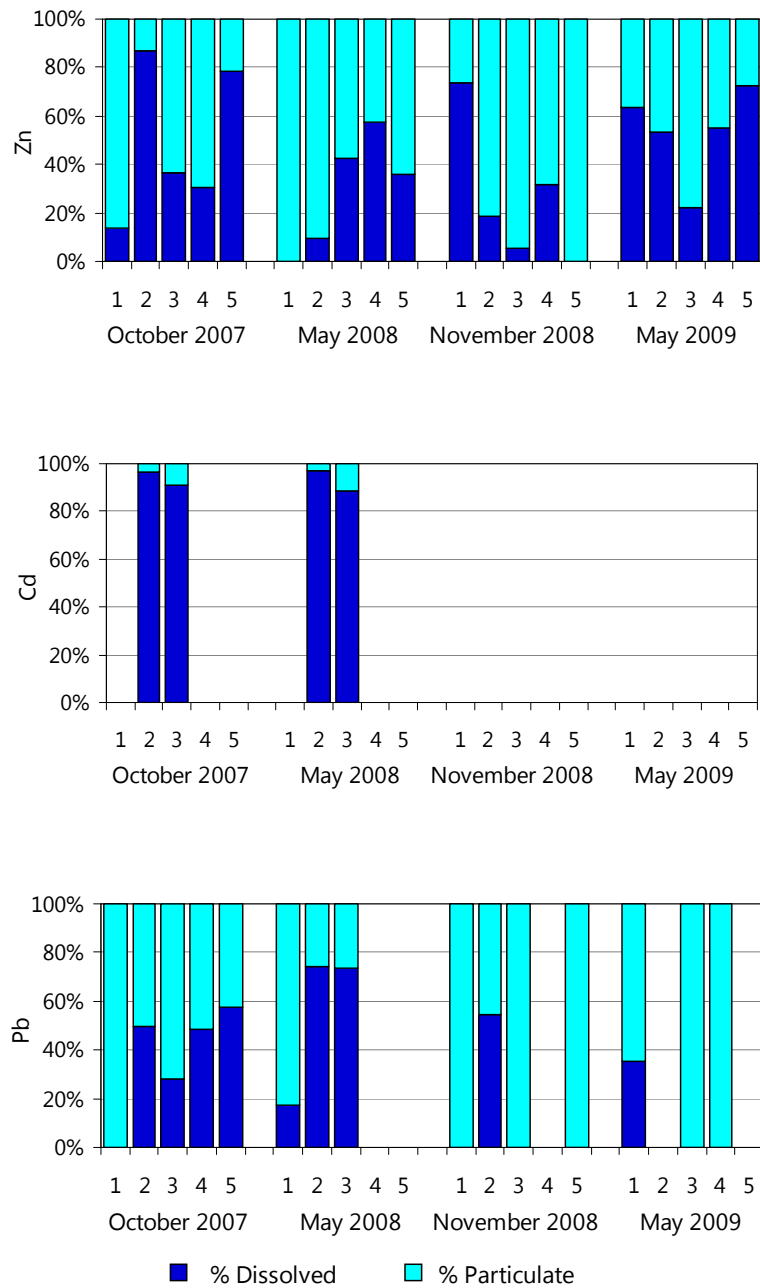


Figure S.40. Distribution of dissolved and particulate metal in water samples

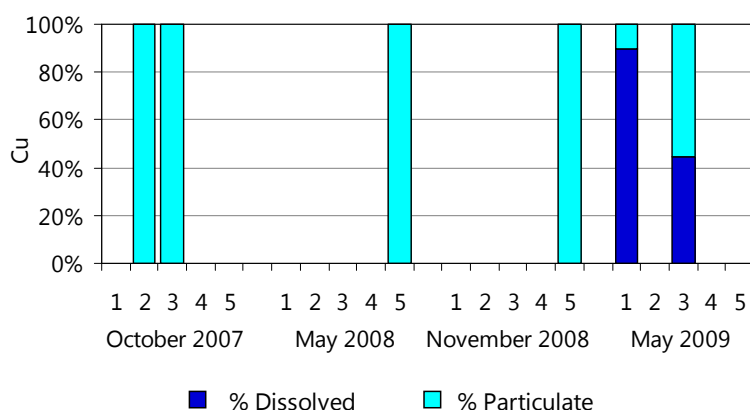


Figure S.40 (cont.). Distribution of dissolved and particulate metal in water samples

In general terms, metals showed heterogeneous results where Zn presented more percentage of particulate metal. In contrast, Cd was mainly found in dissolved form (>88%). Pb and Cu distribution depended on the sampling, basically particulate in samplings 3 and 4, meanwhile distribution were more homogeneous in samplings 1 and 2 for Pb and mainly particulate in samplings 1, 2 and 3 for Cu. In the last sampling, points 1 and 3 (Getares beach and Palmones) showed dissolved content, which was higher than particulate in Getares beach.

Due to the greater hazardousness of dissolved metal content it was analysed and ordered from highest to lowest distributed as follows: Cd > Zn \approx Cu \approx Pb (mean values: 100%, 39,4%, 33,5%, 31,3%, respectively). From these results it can be concluded that cadmium presents more dissolved content than the other metal ions. It means this metal is more bioavailable for being assimilated by aquatic biota.

In order to assess the potential hazardous impacts, the heavy metal levels in water have been compared with reported reference values, background and natural concentration, and also compared with quality guidelines for protection of aquatic life proposed by several organizations, guidelines and imperative values of regional government (Table S.18). The Criteria Maximum Concentration (CMC) is an estimate of the highest concentration of a substance in surface water to which an aquatic community can be exposed briefly without resulting in an unacceptable effect. The Criteria Continuous Concentration (CCC) is an estimate of the highest concentration of a substance in surface water to which an aquatic community can be exposed indefinitely without resulting in an unacceptable effect. All detected concentrations are

higher than background and natural levels, but lower than those proposed by EPA Criteria CMC and CCC, and the ones proposed by the regional government. It can be concluded that the bioavailability of the studied metals was higher for cadmium but dissolved levels (lower than total ones) do not suggest any risk to the aquatic life of the ecosystem. However, it must be indicated that copper is the metal closer to CCC level. The principal reason of these concentrations can be the renewal of these waters due to currents and the tendency of these metals to be accumulated in the sediments.

Table S.18. Background levels, natural concentration and guidelines levels of metals ($\mu\text{g L}^{-1}$) in water described in the literature

Metal	Background level [Förstner and Wittman, 1983] ⁽¹⁾	Natural concentration [Azcue, 1993] ⁽¹⁾	NOAA-EPA criteria [USEPA 2002]		Quality of water (BOJA 27, 04/03/1997) ⁽⁴⁾	
			CMC ⁽²⁾	CCC ⁽³⁾	Clasification of waters	Imperative values
Zn	0.01	<0.6	90	81	Limited	80
					Non limited	60
Cd	0.01	<0.025	40	8.8	Limited	5
					Non limited	2,5
Pb	0.005-0.015	<0.02	210	8.1	Limited	20
					Non limited	10
Cu	0.04-0.1	0.01	4.8	3.1	Limited	40
					Non limited	20

⁽¹⁾ Total metal concentration

⁽²⁾ CMC: criteria maximum concentration (dissolved metal)

⁽³⁾ CCC: criteria continuous concentration (dissolved metal)

⁽⁴⁾ Imperative values (total metal) proposed by Andalusian Government (Spain)

➤ Metal concentration in sediments

(a) *Total metal*

Total concentration levels of metals in sediments taken from Algeciras Bay are shown in Figure S.41. Concentration values are within the following ranges: Zn: 27.49-103.23 mg kg^{-1} ; Cd: <LD-0.37 mg kg^{-1} ; Pb: 9.68-30.44 mg kg^{-1} ; Cu: 4.32-29.22 mg kg^{-1} , and mean values were: Zn: $52.61 \pm 19.28 \text{ mg kg}^{-1}$; Cd: $0.15 \pm 0.13 \text{ mg kg}^{-1}$; Pb: $21.38 \pm 5.10 \text{ mg kg}^{-1}$ and Cu: $16.63 \pm 6.96 \text{ mg kg}^{-1}$. From these data, the metals can be put ordered from highest to lowest average content in the bay: $[\text{Zn}] > [\text{Pb}] \approx [\text{Cu}] > [\text{Cd}]$. In general,

Palmones site presented higher total metal content in sediments, due to it is near to Acerinox stainless steel industry, where heavy metals such as Zn and Cu are widely used. Zinc is primarily used as a coating on iron and steel to protect against corrosion, whilst Cu is a metal employed in the manufacturing process to make these materials more resistant. However, it is Ni and Cr the most common heavy metals in this kind of industries, with mean values of $141.33 \text{ mg kg}^{-1}$ for Ni and $316.52 \text{ mg kg}^{-1}$ for Cr [Díaz de Alba, 2013]. However, Cd and Pb can be emitted by thermal power plants. In the case of Cd, some sediments content was below the detection limit for ICP-MS technique at some sampling points in samplings 1 and 2. However, metal concentration was observed in last samplings. It may suggest that metals could be deposited at seabed over time.

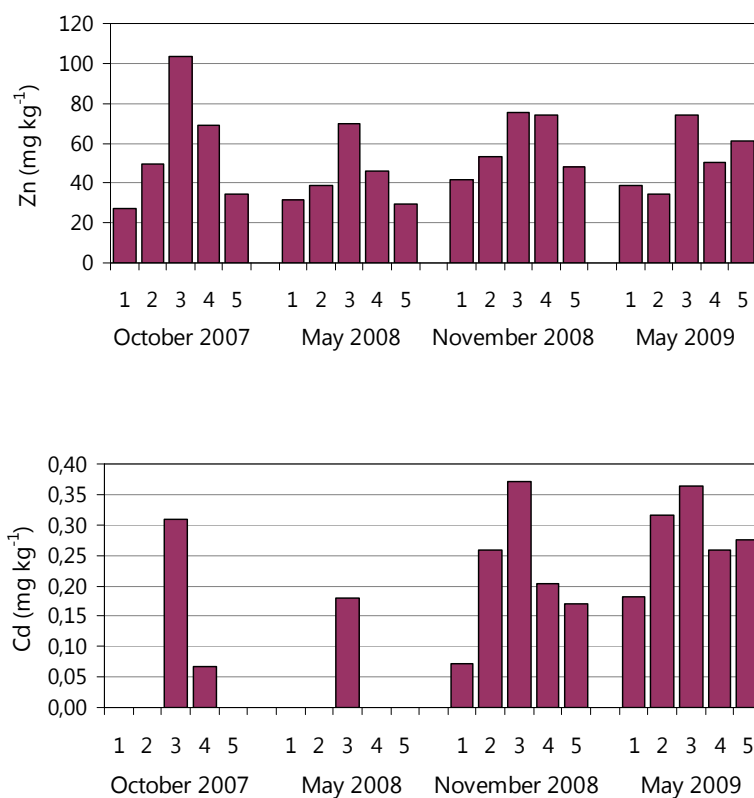


Figure S.41. Zn and Cd total metal concentrations in sediments at the sampling sites in Algeciras Bay

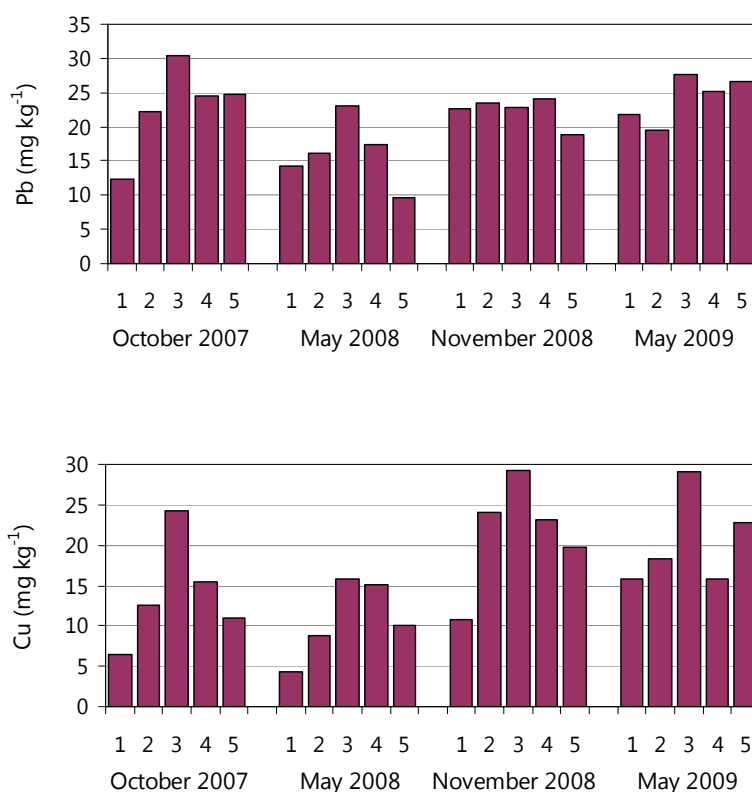


Figure S.41 (cont.). Pb and Cu total metal concentrations in sediments at the sampling sites in Algeciras Bay

Numerous sediment quality guidelines are used to protect the aquatic biota from the harmful and toxic effects related with sediment-bound contaminants; they are useful assessment tool of the potential pollution [Casado-Martínez et al., 2006; McCready et al., 2006]. These guidelines evaluate the degree to which the sediment-associated chemical status might adversely affect aquatic organisms and are designed for the interpretation of sediment quality. Some of the SQGs are given in Table S.19 and the results of our studies were compared to them. ISQG is the concentration below which adverse effects are expected to occur rarely; PEL represents the concentration above which adverse effects are expected to occur frequently. The National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) developed a set of empirical SQGs [Long et al., 1995] that provides two values, effects range low (ERL) and effects range high

(ERM), which delineate three concentration ranges for each particular chemical and the corresponding estimation of the potential biological effect.

Table S.19. Guidelines levels of metals in marine sediments described in the literature (mg kg^{-1})

Metal	Average values for continental shale [Turekian and Wedepohl, 1961]	Canadian SQG [Canadian Sediment Quality Guidelines, 2002]		Niveles NS&T levels (NOAA) [Buchman, 2008]	
	Background levels	ISQG ⁽¹⁾	PEL ⁽²⁾	ERL ⁽³⁾	ERM ⁽⁴⁾
Zn	95	124	271	150	410
Cd	0.3	0.7	4.2	1.2	9.6
Pb	20	30.2	112	46.7	218
Cu	45	18.7	108	34	270

⁽¹⁾ ISQG: interim marine sediment quality guidelines

⁽²⁾ PEL: probable effects levels

⁽³⁾ ERL: effects range low

⁽⁴⁾ ERM: effects range medium

In general, Zn concentrations in sediments were within the natural background levels but they are lower than ISQG, ERL, PEL and ERM levels. Cd had the same trend, except some concentrations in Palmones site, which were slightly higher than the background level but did not exceed the other guideline levels (although ISQG and ERL levels are low). In the case of Pb, most determinations were higher than the natural background level and reach ISQG level at Palmones site in autumn 2007. Several points are near to this level. Results obtained in spring 2008 were lower than the rest. In connection with Cu, Palmones, Guadarranque and Puente Mayorga sites exceeded ISQG levels, being near to ERL values. In principle, episodes of marine toxicity due to these concentrations in sediments are not expected.

(b) Speciation of metals in sediments

The distribution of metals in sediments (in percentage) following BCR procedure is shown in Figure S.42. In general, Cu is the lowest bioavailable metal in sediments being mainly associated with the residual phase, which means that they are tightly associated to the crystal structure of the sediment and it is very difficult to mobilize them unless very extreme conditions exist. Pb and Cu present the higher content in the oxidisable phase, due to the affinity of this metal to organic matter that leads to form complex with this substances. When these complexes are in contact with oxygen-rich water they can be oxidised and Cu can be released to the water column [Morillo et al., 2007]. Zn and Pb presented higher percentage in the reducible phase than Cu and Cd. This fact can be associated to the capacity of Fe and Mn oxides, presents in sediments, to capture Pb and Zn. Zinc also showed some mobility in sediments (apart from Cd), due to it is present in the acid-soluble fraction especially in the central coastal area, and it can therefore be expected that the exchange of this element between sediment and the water column will take place easily [Morillo et al., 2004]. Cadmium associates mainly with the carbonate fraction, being the most bioavailable of the studied metals. The strong association of Cd with the carbonate fraction is most probably owing to the similarity of the ionic radius of Cd (0.97 Å) and Ca (0.99 Å), since Cd will co-precipitate with carbonates and enter the calcite crystal as a camouflaged element [Korfali and Davies, 2004]. According to these findings, the availability of metals in sediment follows this order: Cd > Zn > Cu ≈ Pb.

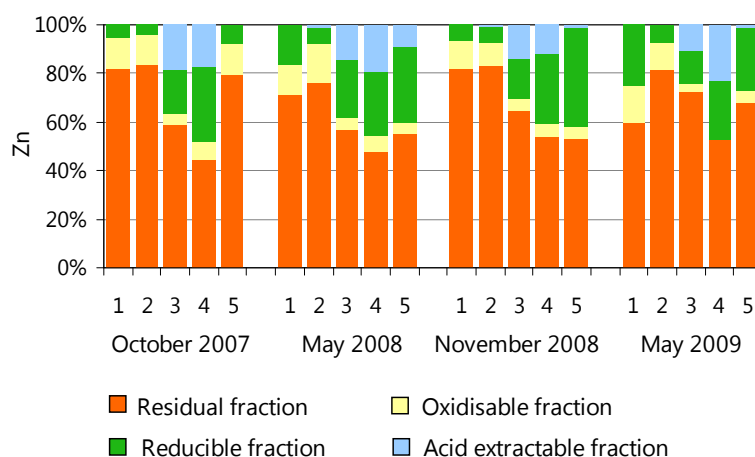


Figure S.42. Metal speciation in sediments samples at the sampling points

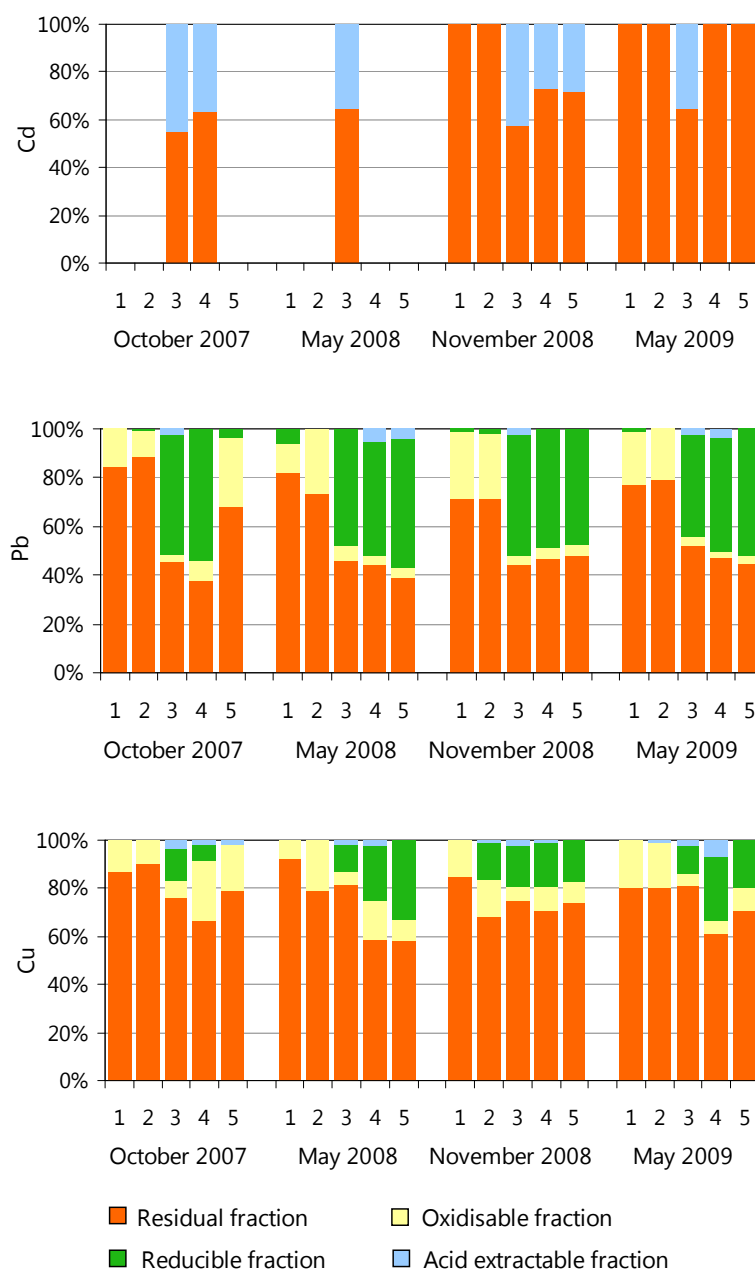


Figure S.42 (cont.). Metal speciation in sediments samples at the sampling points

➤ Metal concentration in fish

The metal concentrations in muscle, gill and liver of 47 *Solea senegalensis* specimens, 22 *Trigloporus lastoviza*, 14 *Scorpaena porcus* and 5 *Diplodus sargus sargus* were analysed. Average metal concentrations in different tissues are showed in Table S.20 and Table S.21. According to experimental data, the metal content in fish (considering all the tissues) can be sorted as: [Zn] ≥ [Cu] > Pb ≥ Cd

Table S.20. Minimum-maximum ranges and average metal concentration at each sampling point

Sampling point	Tissue	Minimum-maximum range and mean value (mg kg ⁻¹)			
		Zn	Cd	Pb	Cu
1 Getares beach	Gills (n ⁽¹⁾ =40)	(5.89-1152.54) 98.14±195.51	(<LD) <LD	(<LD-39.08) 3.05±7.35	(0.55-10.56) 3.22±1.60
	Liver (n=33)	(17.41-503.00) 121.32±86.14	(0.06-2.90) 0.96±0.70	(<LD-7.71) 2.76±2.05	(3.76-1492.31) 313.33±335.11
	Muscle (n=40)	(12.33-43.78) 20.07±7.47	(<LD) <LD	(<LD-3.13) <LD ⁽²⁾	(0.28-1.98) 0.82±0.37
2 Isla Verde	Gills (n=9)	(38.45-80.67) 61.19±12.04	(<LD-0.21) <LD	(<LD-4.63) 1.25±1.45	(1.20-3.78) 2.45±0.93 ⁽³⁾
	Liver (n=7)	(71.90-475.08) 206.82±136.79	(0.22-3.83) 1.36±1.55	(<LD-2.06) 0.73±0.81	(9.28-635.56) 104.41±234.33
	Muscle (n=8)	(12.50-46.58) 23.96±11.50	(<LD) <LD	(<LD) <LD	(0.30-2.02) 0.74±0.67
3 Palmones	Gills (n=18)	(<LD-74.30) 65.82±17.43	(<LD-0.10) <LD	(<LD-7.06) 2.14±1.78	(<LD-31.83) 4.37±8.23
	Liver (n=18)	(67.54-249.97) 127.26±43.95	(<LD-2.53) 0.38±0.58	(<LD-5.12) 1.03±1.39	(9.52-426.23) 91.64±131.81
	Muscle (n=21)	(<LD-259.84) 29.96±53.05	(<LD-0.40) <LD	(<LD-1.06) <LD	(<LD-2.48) 1.17±0.64 ⁽⁴⁾
4 Guadarranque	Gills (n=12)	(57.59-111.29) 69.73±19.51	(<LD-0.11) <LD	(<LD-2.31) 0.76±0.74	(1.39-9.87) 2.91±2.28
	Liver (n=11)	(13.71-298.99) 138.87±90.12	(<LD-1.73) 0.79±0.51	(<LD-2.56) 0.88±0.96	(6.96-262.22) 69.05±89.61
	Muscle (n=11)	(11.68-41.51) 21.97±8.04	(<LD-0.10) <LD	(<LD-1.49) 0.20±0.45	(0.35-10.14) 1.55±2.86
5 Puente Mayorga	Gills (n=8)	(<LD-151.47) 67.73±41.36	(<LD-0.52) <LD	(0.51-8.20) 2.58±3.06	(2.10-34.08) 7.43±10.81
	Liver (n=7)	(62.99-126.99) 103.56±27.40	(<LD-1.22) 0.47±0.48	(<LD-7.56) 2.35±2.90	(1.97-1504.65) 268.38±547.95
	Muscle (n=7)	(16.29-25.48) 19.46±3.04	(<LD) <LD	(<LD-0.29) <LD	(0.57-2.10) 1.03±0.53

⁽¹⁾ n: analysed samples; ⁽²⁾ n=39; ⁽³⁾ n=8; ⁽⁴⁾ n=20

Table S.21. Minimum-maximum ranges and average metal concentration for each fish specie

Fish specie	Tissue	Minimum-maximum range and mean value (mg kg ⁻¹)			
		Zn	Cd	Pb	Cu
<i>Solea senegalensis</i>	Gills (n ⁽¹⁾ =46)	(5.89-151.47) 58.52±18.69	(<LD-0.52) <LD	(<LD-39.08) 2.76±6.46	(0.55-34.08) 5.29±6.85
	Liver (n=39)	(13.71-157.36) 98.74±32.25	(<LD-2.90) 0.84±0.61	(<LD-7.71) 2.95±2.03	(20.37-1504.65) 356.05±353.84
	Muscle (n=46)	(<LD-32.28) 17.48±5.14	(<LD-0.10) <LD	(<LD-0.34) <LD ⁽²⁾	(<LD-10.14) 0.98±1.44
<i>Scorpaena porcus</i>	Gills (n=15)	(38.45-111.29) 68.16±22.16	(<LD-0.21) <LD	(<LD-2.48) 0.76±0.80	(1.26-4.22) 2.28±0.96 ⁽³⁾
	Liver (n=12)	(68.29-475.08) 223.68±118.21	(0.16-3.83) 1.01±1.10	(<LD-1.51) 0.20±0.48	(3.76-50.58) 17.64±13.39
	Muscle (n=15)	(14.03-41.51) 26.35±8.01	(<LD) <LD	(<LD-3.13) 0.32±0.82	(0.30-2.02) 0.98±0.59
<i>Trigloporus lastoviza</i>	Gills (n=21)	(<LD-1152.54) 112.00±239.29	(<LD) <LD	(<LD-4.19) 1.37±1.08	(<LD -8.56) 2.96±1.85
	Liver (n=20)	(62.99-503.00) 144.68±94.18	(<LD-2.53) 0.39±0.56	(<LD-2.38) 0.65±0.57	(1.97-179.49) 29.58±39.34
	Muscle (n=21)	(11.68-259.84) 30.47±52.72	(<LD-0.40) <LD	(<LD -1.49) 0.18±0.42	(0.35-2.48) 1.11±0.58 ⁽⁴⁾
<i>Diplodus sargus saurgus</i>	Gills (n=5)	(68.53-648.51) 198.46±252.11	(<LD) <LD	(1.11-20.13) 6.87±7.60	(1.20-2.93) 2.23±0.69
	Liver (n=5)	(65.70-157.89) 113.18±41.95	(0.40-3.26) 1.50±1.28	(0.62-5.70) 2.09±2.05	(10.88-607.24) 133.88±264.66
	Muscle (n=5)	(15.97-46.58) 32.50±13.08	(<LD) <LD	(<LD-0.94) 0.19±0.42	(0.33-1.35) 0.88±0.50

⁽¹⁾ n: analysed samples; ⁽²⁾ n=45; ⁽³⁾ n=14; ⁽⁴⁾ n=20

- From this data, it can be concluded that Zn is accumulated mostly in liver but also in gills and muscle (at lower concentrations). Higher mean values in liver was registered in Getares beach and Isla Verde sites. However, a specific high value was registered in gills in November 2008 (1152.54 mg kg⁻¹). Getares beach showed the higher Zn concentration in gills, being very similar in the rest of sampling sites (mean value of 60 mg kg⁻¹ approximately). In muscle tissues mean values were very homogeneous in every sampling site, but it was found a remarkable value (259.84 mg kg⁻¹) at Palmones point in May 2008.

- Cd concentrations in gills and muscle tissues were below the limit of detection of the ICP-MS, being detectable for liver samples (maximum value of 3.83 mg kg^{-1} at Isla Verde in November 2008). Concentrations in liver were similar in all sampling points, being higher in Isla Verde (mean: $1.36 \pm 1.55 \text{ mg kg}^{-1}$).

- Pb is preferably accumulated in liver and gills. Muscle is a secondary tissues for Pb bioaccumulation and mean value in muscle was found to be below to the limit of detection for all sampling sites except in Guadarranque (mean value: $0.20 \pm 0.45 \text{ mg kg}^{-1}$; maximum value: 3.13 mg kg^{-1}). Getares beach, Isla Verde, Palmones and Puente Mayorga registered higher mean values in gills, meanwhile higher values were obtained in liver for Guadarranque sampling site.

- Cu accumulation in fish occurs mainly in liver following by gills and muscle. Regarding sampling sites it should be noted that higher levels of Cu have been found in liver of fish captured in Getares beach ($313.33 \text{ mg kg}^{-1}$) and Puente Mayorga ($268.38 \text{ mg kg}^{-1}$). In gill and muscle tissues the concentrations were similar in all sampling points.

From higher to lowest metal accumulation, the trend in the different tissues was:

- Gills: $\text{Zn} > \text{Cu} \approx \text{Pb} > \text{Cd}$
- Liver: $\text{Cu} \approx \text{Zn} > \text{Pb} \approx \text{Cd}$
- Muscle: $\text{Zn} > \text{Cu} > \text{Pb} \approx \text{Cd}$

Zn is preferably accumulated in the 4 fish species, especially in gill tissues of *Solea senegalensis*; Cd is accumulated in liver of all species; Pb in gills of *Solea senegalensis* and *Diplodus sargus sargus*; and Cu in liver tissues of *Solea senegalensis* and *Diplodus sargus sargus*.

Compared the concentration obtained in fish with some reference values, shown in Table S.22, most of sample points exceed these values, principally in gills and liver tissues.

Table S.22. Maximum and standards levels in mg kg⁻¹ (wet weight) of metals in fish described in the literature

Metal	Maximum levels (EC, 2006) ⁽¹⁾	Tolerance level in fish (FAO/WHO, 1989; ITS, 2000) ⁽²⁾	Turkish guidelines (1988) ⁽²⁾	Argentine Food codex (CAA)	Australian codex (ANZFA)
Zn		50	50		
Cd	0,05 ^a 0,10 ^b 0,30 ^c	0,1	0,1	1,0	0,2
Pb	0,3	0,5	1	2	0,5
Cu			20		10

⁽¹⁾ Reglamente EC, No 1881/2006 [EC, 2006]

^a Muscle meat of fish excluding species listed in (b) and (c).

^b Muscle meat of following fish: anchovy, bonito, common two-banded seabream, eel, grey mullet, horse mackerel or scad, louver or luvar, sardine, sardinops, tuna and wedge sole.

^c Muscle meat of swordfish.

⁽²⁾ [Demirak et al., 2006]

Conclusions

In conclusion, the metallic contamination (Zn, Cd, Pb and Cu) of water and sediment of Algeciras Bay was investigated in this study. The metal concentrations in water were found to be [Zn] > [Pb] > [Cu] > [Cd], highlighting the low content of cadmium. In sediments, the metal concentration can be ranged as follows: [Zn] > [Pb] ≈ [Cu] > [Cd]. Metal concentrations were compared with quality guidelines values and some concentrations for Pb and Cu exceeded ISQG reference value for sediments. In addition, speciation analysis of sediment and water was performed providing information of availability of metal. Cadmium was the most available metal in water and sediments, with high tendency to stay in water in dissolved form. The effect of this pollution was studied by evaluation of metal accumulations in four species of fish (*Solea senegalensis*, *Scorpaena porcus*, *Trigloporus lastoviza* and *Diplodus sargus sargus*). For that, analysis of metal concentrations in gill, liver and muscle were accomplished. The metal content in fish can be sorted as: gills: Zn > Cu ≈ Pb > Cd; liver: Cu ≈ Zn > Pb ≈ Cd; muscle: Zn > Cu > Pb ≈ Cd. Zn is preferably accumulated in the 4 fish species, especially in gill tissues of *Solea senegalensis*; Cd is accumulated in liver of all species; Pb in gills of *Solea senegalensis* and *Diplodus sargus sargus*; and Cu in liver tissues of *Solea senegalensis* and *Diplodus sargus sargus*. Hence, the most affected species was found to be *Solea senegalensis* due to its benthic character and *Diplodus sargus sargus*.

Although the waters samples were not highly contaminated, it has been shown that pollution from industrial activities, sewage from the city of Algeciras and maritime activities from the Algeciras Port are affecting the sediments and, above all, fish of this ecosystem. According to these studies there is a slight pollution of Pb and Cu in sediments and important bioaccumulation of Zn, Cd, Pb and Cu in some fish, which has to be taken into account, especially as they can enter in the food chain and cause serious damages in human beings.

Conclusions

Taking into account all the results that have been obtained from the research in this thesis, the main conclusions can be listed as follows:

1. The aim of this work was the development of a new method for separation/preconcentration, and subsequently determination by atomic spectroscopy, of lead traces in natural water samples. The method employed a bulk liquid membrane using the thiosemicarbazone 2-hydroxybenzaldehyde-N-ethylthiosemicarbazone (2-HBET) as metal carrier. Pb(II) could be effectively transported, through the liquid membrane with good preconcentration efficiency and the range of application was adequate for analysing a wide range of Pb(II) concentrations. The proposed method was applied satisfactorily to the analysis of real seawater with complex saline and metal matrices, avoiding typical problems that occur when these complex samples are analysed directly.
2. Two Schiff base molecules were synthesised and applied as fluorescent sensor in solution to the determination of Fe(III) in aquo-organic medium. The thiosemicarbazone 2-HNPT produced an increase in initial fluorescence of the sensor (type "Off-On") while in the case of the pyridine derivative 2,6-HNDP resulted in a fluorescence quenching of initial fluorescence of the sensor (type "On-Off") when it was in contact with iron. These researches showed the development of two simple, rapid, low cost and highly selective methods. These sensors have not been applied to real samples, so that in case of satisfactory performance, a miniaturised fiber optic sensor for in situ analysis of iron may be developed.
3. Finally, the level of contamination produced by some heavy metals has been assessed in water, sediments and biota from Algeciras Bay. The studies can be summarized as follows:

- Total levels of metals (Zn, Cd, Pb and Cu, very common metals in industry) and their distribution in different chemical fractions (speciation) have been evaluated in water and sediments. The results showed that Zn was the metal which presented the highest concentration in water and sediments. Regarding speciation, Cd was the most available metals in water and sediments. Metal concentrations were compared with quality guidelines values and some concentrations for Pb and Cu exceeded ISQG reference value for sediments but not reaching dangerous levels.
- The effect of this pollution was studied by evaluation of metal accumulations in four species of fish (*Solea senegalensis*, *Scorpaena porcus*, *Trigloporus lastoviza* and *Diplodus sargus sargus*). For that, analysis of metal concentrations in gill, liver and muscle were accomplished. The metal content in fish can be sorted as: gills: Zn > Cu \approx Pb > Cd; liver: Cu \approx Zn > Pb \approx Cd; muscle: Zn > Cu > Pb \approx Cd. Zn is preferably accumulated in the 4 fish species, especially in gill tissues of *Solea senegalensis*; Cd is accumulated in liver of all species; Pb in gills of *Solea senegalensis* and *Diplodus sargus sargus*; and Cu in liver tissues of *Solea senegalensis* and *Diplodus sargus sargus*. Hence, the most affected species was found to be *Solea senegalensis* due to its benthic character and *Diplodus sargus sargus*.
- To asses the state of contamination in Algeciras Bay pollution indexes were calculated. As a result, Getares, Isla Verde and Palmones presented highest metal contamination in water. In the case of sediments, Palmones was the site more with highest contamination index. According to sediment pollution indicators, the bay is slightly contaminated by Zn and Cu, and with a bit alarming level by Pb, which has to be taken into account. In fish, the sampling points most contaminated were Palmones for Zn, Isla Verde for Cd, Getares, Palmones and Guadarranque and Puente Mayorga for Pb and Guadarranque for Cu.

References

- Adamo** P. and Zampella M. "Chapter 9 – Chemical speciation to assess potentially toxic metals' (PTM's) bioavailability and geochemical forms in polluted soils". *Environmental Geochemistry*, 175-212 (2008).
- Alegret** S., del Valle M., Merkoçi A. "Sensores electroquímicos". Servicio de Publicaciones de la Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Química. Grupo de Sensores y Biosensores (2004).
- Aljahdali** M. and El-Sherif A.A. "Synthesis, characterization, molecular modeling and biological activity of mixed ligand complexes of Cu(II), Ni(II) and Co(II) based on 1,10-phenanthroline and novel thiosemicarbazone". *Inorganica Chimica Acta* 407, 58-68 (2013).
- Alonso-Castillo** M.L., Sánchez-Trujillo I., Vereda-Alonso E., García-de Torres A., Cano-Pavón J.M. "Bioavailability of heavy metals in water and sediments from a typical Mediterranean Bay (Málaga Bay, Region of Andalucía, Southern Spain)". *Marine Pollution Bulletin* (Article in Press) (2013).
- Álvarez-Iglesias** P., Rubio B., Millos J. "Isotopic identification of natural vs. anthropogenic lead sources in marine sediments from the inner Ria de Vigo (NW Spain)". *Science of the Total Environment* 437, 22-35 (2012).
- Antholine** W., Knight J., Whelan H., Petering D. "Studies of the reaction of 2-formylpyridine thiosemicarbazone and its iron and copper complexes with biological systems". *Molecular Pharmacology* 13, 89-98 (1977).
- Aouarram** A., Galindo-Riano M.D., Garcia-Vargas M., Stitou M., El Yousfi F. "A permeation liquid membrane system for determination of nickel in seawater". *Talanta* 71, 165-170 (2007).
- Azcue** J.M. "Metales en Sistemas Biológicos: Metales en el medio Ambiente". Ed. PPU, Barcelona (1993).
- Bastami** K.D., Bagheri H., Kheirabadi V., Zaferani G.G., Teymori M.B., Hamzehpoor A., Soltani F., Haghparast S., Harami S.R., Ghorghani N.F., Ganji S. "Distribution and ecological risk assessment of heavy metals in surface sediments along southeast coast of the Caspian Sea". *Marine Pollution Bulletin* 81, 262-267 (2014).

Berkowitz B., Dror I., Yaron B. "Contaminant Geochemistry. Interactions and transport in the subsurface environment". Ed. Springer-Verlag (Germany) (2008).

Bhardwaj V.K., Pannu A.P.S., Singh N., Hundal M.S., Hundal G. "Synthesis of new tripodal receptors - a 'PET' based 'off-on' recognition of Ag^+ ". *Tetrahedron* 64, 5384-5391 (2008).

Biran I., Yu X., Walt D.R. "Chapter 1 - Optrode-Based Fiber Optic Biosensors (Bio-Optrode)"; en: Ligler F.S., Rowe Taitt, C.A. (Eds.), "Optical Biosensors: "Today and Tomorrow (Second Edition)". Elsevier (2008).

Bjerregaard P. and Andersen O. "Chapter 13 – Ecotoxicology of Metals - Sources, Transport, and Effects in the Ecosystem". *Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition)*, 251-280 (2007).

Buchman M.F. "NOAA Screening Quick Reference Tables", NOAA OR&R Report 08-1. Seattle WA, Office of Response and Restoration Division, National Oceanic and Atmospheric Administration, 34 pages (2008).

Callan J.F., De Silva A.P., Magri D.C. "Luminescent sensors and switches in the early 21st century". *Tetrahedron* 61, 8551-8588 (2005).

Canadian Sediment Quality Guidelines for the protection of Aquatic life. *Canadian Council of Ministers of Environment* (2002).

Casado-Martínez M.C., Beiras R., Belzunce M.J., González-Castromil M.A., Marín-Guirao L., Postma J.F., Riba I., DelValls T.A. "Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. IV: Whole sediment toxicity test using crustacean amphipods". *Ciencias Marinas* 32, 149-157 (2006).

Chakraborty P. "Speciation of Co, Ni and Cu in the coastal and estuarine sediments: Some fundamental characteristics". *Journal of Geochemical Exploration* 115, 13-23 (2012).

Chapman P.M. "Determining when contamination is pollution - Weight of evidence determinations for sediments and effluents". *Environment International* 33, 492-501 (2007).

Clark R.B. "Marine Pollution" (Fifth Edition). Oxford University Press (2001).

Crichton R.R. "Chapter 1 - An Overview of Metals and Selected Nonmetals in Biology". *Biological Inorganic Chemistry (Second Edition)*, 1-19 (2012).

Crompton T.R. "Toxicants in aqueous ecosystems. A guide for the analytical and environmental Chemist". Ed. Springer-Verlag (Germany) (2007).

Dalali N., Yavarizadeh H., Agrawal Y.K. "Separation of zinc and cadmium from nickel and cobalt by facilitated transport through bulk liquid membrane using trioctyl methyl ammonium chloride as carrier". *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 18, 1001-1005 (2012).

Davidson M.C., Lorna E.W., Ure A.M. "Effect of sample preparation on the operational speciation of cadmium and lead in freshwater sediment". *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 363, 134-136 (1999).

- de Silva** A.P. and Gunaratne H.Q.N. "Fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensors selective for submicromolar calcium with quantitatively predictable spectral and ion-binding properties". *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* (2), 186-188 (1990).
- de Silva** A.P., Gunaratne H.Q.N., Lynch P.L.M. "Luminescence and charge transfer. Part 4. 'On-off' fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors with pyridine receptors: 1,3-Diaryl-5-pyridyl-4,5-dihydropyrazoles". *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 685-690 (1995).
- Demirak** A., Yilmaz F., Tuna A.L., Ozdemir N. "Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in southwestern Turkey". *Chemosphere* 63, 1451-1458 (2006).
- Díaz de Alba** M. "Avances en el control de la contaminación por metales: nuevas metodologías de análisis y especiación metálica en sistemas acuáticos. Estudios en la Bahía de Algeciras". *Tesis Doctoral*. Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica (2013).
- Du** Y., Chen M., Zhang Y., Luo F., He C., Li M., Chen X. "Determination of iron(III) based on the fluorescence quenching of rhodamine B derivative.". *Talanta* 106, 261-265 (2013).
- Duffus** J.H. "'Heavy metals' - A meaningless term?" (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 74, 793-807 (2002).
- EC** (European Commission). "Commission Regulation No. 1881/2006 of December 19, 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs". DOCE, L 364/5-L 364/24 (2006).
- Ensafi** A.A. and Fooladgar E. "Selective lanthanum ions optical sensor based on covalent immobilization of 4-hydroxysalophen on a hydrolyzed triacetylcellulose membrane". *Journal of Analytical Chemistry* 66, 865-870 (2011).
- Fabrizzi** L. and Poggi A. "Sensors and switches from supramolecular chemistry". *Chemical Society Reviews* 24, 197-202 (1995).
- Förstner** U. and Wittmann G.T.W. "Metal pollution in the aquatic environment". Second revised Edition. Springer-Verlag (Germany) (1983).
- Gangaiya** P. and Mahendra N. "Chapter 24: The application of fibre optic chemical sensors for heavy metal monitoring in contaminated environments". *Developments in Soil Science* 32, 589-600 (2008).
- Gao** G.-Y., Qu W.-J., Shi B.-B., Zhang P., Lin Q., Yao H., Yang W.-L., Zhang Y.-M., Wei T.-B. "A highly selective fluorescent chemosensor for iron ion based on 1H-imidazo [4,5-b] phenazine derivative". *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 121, 514-519 (2014).
- González** A., Cervera M.L., Armenta S., de la Guardia M. "A review of non-chromatographic methods for speciation analysis". *Analytica Chimica Acta* 636, 129-157 (2009).
- González** A., Armenta S., Cervera M.L., de la Guardia M. "Non-chromatographic speciation". *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 29, 260-268 (2010).
- Grasshoff** K., Ehrhardt M., Kremling K. "Methods of Seawater Analysis" (Third Edition), Verlag Chemie, Weinheim (Germany) (1999).

Gupta V.K. and Ali I. "Chapter 1 - Introduction". *Environmental Water. Advances in treatment, remediation and recycling*, 1-27 (2013).

Gwaltney-Brant S.M. "Chapter 41 - Heavy metals". *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition), Volume II*, 1315-1347 (2013).

Hancock C.N., Stockwin L.H., Han B., Divelbiss R.D., Jun J.H., Malhotra S.V., Hollingshead M.G., Newton D.L. "A copper chelate of thiosemicarbazone NSC 689534 induces oxidative/ER stress and inhibits tumor growth in vitro and in vivo". *Free Radical Biology & Medicine* 50, 110-121 (2011).

Hänsch R. and Mendel R.R. "Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl)". *Current Opinion in Plant Biology* 12, 259-266 (2009).

Hentze M.W., Muckenthaler M.U., Galy B., Camaschella C. "Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism". *Cell* 142, 24-38 (2010).

Hou D., He J., Lü C., Ren L., Fan Q., Wang J., Xie Z. "Distribution characteristics and potential ecological risk assessment of heavy metals (Cu, Pb, Zn, Cd) in water and sediments from Lake Dalinouer, China". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 93, 135-144 (2013).

<http://www.sigmaaldrich.com/>

Hu B., Cui R., Li J., Wei H., Zhao J., Bai F., Song W., Ding X. "Occurrence and distribution of heavy metals in surface sediments of the Changhua River Estuary and adjacent shelf (Hainan Island)". *Marine Pollution Bulletin* 76, 400-405 (2013a).

Hu S., Wu G., Xu C., Dong J., Gao Q. "A new fluorescent chemosensor for Fe^{3+} based upon 2,5-diphenylfuran and 8-hydroxyquinoline". *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 270, 37-42 (2013b).

Hu G., Chen D., Wang L., Liu J.-C., Zhao H., Liu Y., Qi T., Zhang C., Yu P. "Extraction of vanadium from chloride solution with high concentration of iron by solvent extraction using D2EHPA". *Separation and Purification Technology* 125, 59-65 (2014).

Hua X., Dong D., Liu L., Gao M., Liang D. "Comparison of trace metal adsorption onto different solid materials and their chemical components in a natural aquatic environment". *Applied Geochemistry* 27, 1005-1012 (2012).

Ianni C., Magi E., Soggia F., Rivarolo P., Frache R. "Trace metal speciation in coastal and off-shore sediments from Ross Sea (Antarctica)". *Microchemical Journal* 96, 203-212 (2010).

Issa R.M., Khedr A.M., Rizk H. "H NMR, IR and UV/VIS spectroscopic studies of some Schiff bases derived from 2-aminobenzothiazole and 2-amino-3-hydroxypyridine". *Journal of the Chinese Chemical Society* 55, 875-884 (2008).

Jiang X.-J., Fu Y., Tang H., Zang S.-Q., Hou H.-W., Mak T.C.K., Zhang H.-Y. "A new highly selective fluorescent sensor for detection of Cd^{2+} and Hg^{2+} based on two different approaches in aqueous solution". *Sensors and Actuators B* 190, 844-850 (2014).

- Job P.** "Formation and stability of inorganic complexes in solution". *Annales de Chimie* 9, 113-203 (1928).
- Kamila S., Callan J.F., Mulrooney R.C., Middleton M.** "A novel fluorescent chemosensor for Cu(II) in aqueous solution based on a β -aminobisphosphonate receptor". *Tetrahedron Letters* 48, 7756-7760 (2007).
- Kirkbright G.F., West T.S., Woodward C.** "Spectrofluorometric determination of submicrogram amounts of aluminum and beryllium with 2-hydroxy-3-naphthoic acid". *Analytical Chemistry* 37, 137-143 (1965).
- Kislik V.S.** "Liquid Membranes. Principles and Applications in Chemical Separations and Wastewater Treatment" (First Edition), Elsevier (2010).
- Kislik V.S.** "Solvent Extraction" (First Edition), Elsevier (2012).
- Koduru J.R. and Lee K.D.** "Evaluation of thiosemicarbazone derivative as chelating agent for the simultaneous removal and trace determination of Cd(II) and Pb(II) in food and water samples". *Food Chemistry* 150, 1-8 (2014).
- Korfali S.I. and Davies B.E.** "Speciation of metals in sediment and water in a river underlain by limestone: role of carbonate species for purification capacity of rivers". *Advances in Environmental Research* 8, 599-612 (2004).
- Koter S., Szczepański P., Mateescu M., Nechifor G., Badalau L., Koter I.** "Modeling of the cadmium transport through a bulk liquid membrane". *Separation and Purification Technology* 107, 135-1432 (2013).
- Lakowicz J.R.** "Principles of Fluorescence Spectroscopy" (Third Edition), Ed. Springer (Germany) (2006).
- Li Z., Zhang L., Li X., Guo Y., Ni Z., Chen J., Wei L., Yu M.** "A fluorescent color/intensity changed chemosensor for Fe^{3+} by photo-induced electron transfer (PET) inhibition of fluoranthene derivate". *Dyes and Pigments*, 94, 60-65(2012).
- Li H., Li L., Yin B.** "Highly selective fluorescent chemosensor for Fe^{3+} detection based on diaza-18-crown-6 ether appended with dual coumarins". *Inorganic Chemistry Communications*, In Press, Accepted Manuscript, Available online 15 January (2014a).
- Li C.-Y., Zou C.-X., Li Y.-F., Tang J.-L., Weng C.** "A new rhodamine-based fluorescent chemosensor for Fe^{3+} and its application in living cell imaging". *Dyes and Pigments* 104, 110-115 (2014b).
- Li Z., Zhou Y., Yin K., Yu Z., Li Y., Ren J.** "A new fluorescence "turn-on" type chemosensor for Fe^{3+} based on naphthalimide and coumarin". *Dyes and Pigments*, In Press, Accepted Manuscript, Available online 8 January (2014c).
- Lieu P.T., Heiskala M., Peterson P.A., Yang Y.** "The roles of iron in health and disease". *Molecular Aspects of Medicine* 22, 1-87 (2001).
- Lin W., Long L., Yuan L., Cao Z., Feng J.** "A novel ratiometric fluorescent Fe^{3+} sensor based on a phenanthroimidazole chromophore". *Analytica Chimica Acta* 634, 262-266 (2009).

Lin Y.-C., Chang-Chien G.-P., Chiang P.-C., Chen W.-H., Lin Y.-C. "Multivariate analysis of heavy metal contaminations in seawater and sediments from a heavily industrialized harbor in Southern Taiwan". *Marine Pollution Bulletin* 76, 266-275 (2013).

Lindsay W.L. and Norvell W.A. "Development of a DPTA soil test for zinc, iron, manganese and copper". *Soil Science Society of American Journal* 42, 421-428 (1978).

Linnaeus C. "Tomus I. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis". Editio decima, reformata. Holmiae. (Laurentii Salvii), [1-4], 1-824 (1758).

Liu S.-B., Bi C.-F., Fan Y.-H., Zhao Y., Zhang P.-F., Luo Q.-D., Zhang D.-M. "Synthesis, characterization and crystal structure of a new fluorescent probe based on Schiff Base for the detection of Zinc (II)". *Inorganic Chemistry Communications* 14, 1297-1301 (2011).

Liu S.-R. and Wu S.-P. "New water-soluble highly selective fluorescent chemosensor for Fe(III) ions and its application to living cell imaging". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 171-172, 1110-1116 (2012).

Liu J., Xie Y.-Q., Lin Q., Shi B.-B., Zhang P., Zhang Y.-M., Wei T.-B. "Dipodal fluorescent chemosensor for Fe³⁺ and resultant complex as a chemosensor for fluoride". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 186, 657-665 (2013).

Long E.R., MacDonald D.D., Smith S.L., Calder F.D. "Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments". *Environmental Management* 19, 81-97 (1995).

Manahan S.E. "Environmental chemistry" (Ninth Edition). CRC Press, Boca Raton: Taylor & Francis Group (2010).

Mansour A.M., Askalany M.S., Madkour H.A., Assran B.B. "Assessment and comparison of heavy metal concentrations in marine sediments in view of tourism activities in Hurghada area, northern Red Sea, Egypt". *Egyptian Journal of Aquatic Research* 39, 91-103 (2013).

Markert B. "Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 21 (SUPPL. 1), 77-82 (2007).

Marshall S.J. "Hydrology". *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences* (2013).

McCready S., Birch G.F., Long E.R. "Metallic and organic contaminants in sediments of Sydney Harbour, Australia and vicinity-a chemical dataset for evaluating sediment quality guidelines". *Environment International* 32, 455-465 (2006).

Morillo J., Usero J., Gracia I. "Heavy metal distribution in marine sediments from the southwest coast of Spain". *Chemosphere* 55, 431-442 (2004).

Morillo J., Usero J., Gracia I. "Potential mobility of metals in polluted coastal sediments in two bays of southern Spain". *Journal of Coastal Research* 23, 352-361 (2007).

Morillo J. and Usero J. "Trace metal bioavailability in the waters of two different habitats in Spain: Huelva estuary and Algeciras Bay". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 851-859 (2008).

- Muthuraman** G., Teng T.T., Leh C.P., Norli I. "Use of bulk liquid membrane for the removal of chromium(VI) from aqueous acidic solution with tri-n-butyl phosphate as a carrier". *Desalination* 249, 884-890 (2009).
- Narayanaswamy** R. "Absorbance Spectroscopy for Chemical Sensors"; en: Steele J.H., Thorpe A.S., Turekian K.K. (Eds.), "Encyclopedia of Ocean Sciences", 6-12. Elsevier (2001).
- Natarajan** S. and Mathews R. "Modeling and proposed mechanism of two radical scavengers through docking to curtail the action of ribonucleotide reductase". *Journal of Biophysics and Structural Biology* 3, 38-48 (2011).
- Noiré** M.H. and Duréault B. "A ferrous ion optical sensor based on fluorescence quenching". *Sensors and Actuators: B. Chemical* 29, 386-391 (1995).
- Nordberg** M., Templeton D.M., Andersen O., Duffus J.H. "Glossary of terms used in ecotoxicology (IUPAC Recommendations 2009)". *Pure and Applied Chemistry* 81, 829-970 (2009).
- Odlare** M. "Introductory Chapter for Water Resources". *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, (2014).
- Orellana** G. and Moreno-Bondi M.C. "Frontiers in Chemical Sensors: Novel Principles and Techniques". Springer Series on Chemical Sensors and Biosensor, Vol. 3. Springer. New York, (2005).
- Oter** O., Ertekin K., Kirilmis C., Koca M., Ahmedzade M. "Characterization of a newly synthesized fluorescent benzofuran derivative and usage as a selective fiber optic sensor for Fe(III)". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 122, 450-456 (2007).
- Parthasarathy** N., Pelletier M., Buffle J. "The use of permeation liquid membrane (PLM) as an analytical tool for trace metal speciation studies in natural waters". *Journal De Physique. IV : JP* 107 (II), 1021-1024 (2003).
- Pemmer** B., Roschger A., Wastl A., Hofstaetter J.G., Wobrauschek P., Simon R., Thaler H.W., Roschger P., Klaushofer K., Streli C. "Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue". *Bone* 57, 184-193 (2013).
- Periáñez** R. and Pascual-Granged A. "Modelling surface radioactive, chemical and oil spills in the Strait of Gibraltar". *Computers and Geosciences* 34, 163-180 (2008).
- Pietrzak** M. "Sensors and Bioselective Reagents". *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (2013).
- Pulido-Tofiño** P., Moreno J.M.B.-M., Pérez-Conde M.C. "A flow-through fluorescent sensor to determine Fe(III) and total inorganic iron". *Talanta* 51, 537-545 (2000).
- Qasem Ali** A., Guan Teoh S., Eltaher Eltayeb N., Khadeer Ahamed M.B., Abdul Majid A.M.S. "Synthesis of copper(II) complexes of isatin thiosemicarbazone derivatives: in vitro anti-cancer, DNA binding, and cleavage activities". *Polyhedron, (Article in press)* (2014).
- Queirós** C., Silva A.M.G., Lopes S.C., Ivanova G., Gameiro P., Rangel M. "A novel fluorescein-based dye containing a catechol chelating unit to sense iron(III)". *Dyes and Pigments* 93, 1447-1455 (2012).

Radojevic M. and Bashkin V.N. "Practical environmental analysis" (Second Edition). The Royal Society of Chemistry, Cambridge (UK) (2006).

Roberts D.A. "Causes and ecological effects of resuspended contaminated sediments (RCS) in marine environments". *Environment International* 40, 230-243 (2012).

Rounaghi G., Mohammadzadeh kakhki R., Eshghi H. "Efficient transport of lead(II) cations in natural water using a liquid membrane system with dicyclohexano-18-crown-6 as carrier". *Arabian Journal of Chemistry* (Article in Press) (2012).

Sánchez-Garrido J.C., García-Lafuente J., Sammartino S., Naranjo C., de los Santos F.I., Álvarez-Fanjul E. "Meteorologically-driven circulation and flushing times of the Bay of Algeciras, Strait of Gibraltar". *Marine Pollution Bulletin* 80, 97-106 (2014).

Schenone N.F., Avigliano E., Goessler W., Fernández Cirelli A. "Toxic metals, trace and major elements determined by ICPMS in tissues of *Parapimelodus valenciennis* and *Prochilodus lineatus* from Chascomus Lake, Argentina". *Microchemical Journal* 112, 127-131 (2014).

Shamsipur M., Sadeghi M., Garau A., Lippolis V. "An efficient and selective fluorescent chemical sensor based on 5-(8-hydroxy-2-quinolinylmethyl)-2,8-dithia-5-aza-2,6-pyridinophane as a new fluoroionophore for determination of iron(III) ions. A novel probe for iron speciation". *Analytica Chimica Acta* 761, 169-177 (2013).

She M., Yang Z., Yin B., Zhang J., Gu J., Yin W., Li J., Zhao G., Shi, Z. "A novel rhodamine-based fluorescent and colorimetric "off-on" chemosensor and investigation of the recognizing behavior towards Fe^{3+} ". *Dyes and Pigments* 92, 1337-1343 (2012).

Singh N., Kaur N., Mulrooney R.C., Callan J.F. "A ratiometric fluorescent probe for magnesium employing excited state intramolecular proton transfer". *Tetrahedron Letters* 49, 6690-6692 (2008).

Singh N., Mulrooney R.C., Kaur N., Callan J.F. "Fluorescent recognition of potassium and calcium ions using functionalised CdSe/ZnS quantum dots". *Journal of Fluorescence* 19, 777-782 (2009a).

Singh N., Kaur N., Dunn J., MacKay M., Callan J.F. "A new fluorescent chemosensor for iron(III) based on the β -aminobisulfonate receptor". *Tetrahedron Letters* 50, 953-956 (2009b).

Singh R., Mehta R., Kumar V. "Simultaneous removal of copper, nickel and zinc metal ions using bulk liquid membrane system". *Desalination* 272, 170-173 (2011).

Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R. "Fundamentos de Química Analítica" (Octava Edición). Ed. Thomson (Spain) (2005).

Templeton D.M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L.G., Muntau H., Van Leeuwen H.P., Lobinski A.R. "Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendation 2000)". *Pure and Applied Chemistry* 72, 1453-1470 (2000).

Turekian K.K. and Wedepohl K.H. "Distribution of the elements in some major units of the earth's crust". *Geological Society of America Bulletin* 72, 175-192 (1961).

Ure A.M. and Davidson C.M. "Chemical Speciation in the environment" (Second Edition). Ed. Blackwell Science, Oxford (UK) (2002).

USEPA (United States Environmental Protection Agency). "National Recommended Water Quality Criteria". EPA-822-r-02-047, Office of Science and Technology (2002).

van Loon G.W. and Duffy S.J. "Environmental Chemistry: a global perspective". Oxford University Press, New York (United States of America) (2011).

Wang J., Zhang D., Liu Y., Ding P., Wang C., Ye Y., Zhao Y. "A N-stablization rhodamine-based fluorescent chemosensor for Fe^{3+} in aqueous solution and its application in bioimaging". *Sensors and Actuators, B: Chemical* 191, 344-350 (2014).

Xu W., Wang X., Cai Z. "Analytical chemistry of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: A review". *Analytica Chimica Acta* 790, 1-13 (2013).

Yan Z., Wang S., Wang H., Wu S. "Bismuth (III) PVC membrane ion selective electrodes based on two compounds: Acylhydrazone and thiosemicarbazone with 1,3,4-thiadiazole". *Materials Science and Engineering C* 33, 2562-2568 (2013).

Yi C., Tian W., Song B., Zheng Y., Qi Z., Qi Q., Sun Y. "A new turn-off fluorescent chemosensor for iron(III) based on new diphenylfluorenes with phosphonic acid". *Journal of Luminescence* 141, 15-22 (2013).

Youssef N.S., El-Seidy A.M.A., Schiavoni M., Castano B., Ragaini F., Gallo E., Caselli A. "Thiosemicarbazone copper complexes as competent catalysts for olefin cyclopropanations". *Journal of Organometallic Chemistry* 714, 94-103 (2012).

Zhang W., Liu X., Cheng H., Zeng E.Y., Hu Y. "Heavy metal pollution in sediments of a typical mariculture zone in South China". *Marine Pollution Bulletin* 64, 712-720 (2012).

Zhang J.X.J. and Hoshino K. "Chapter 1 - Introduction to Molecular Sensors"; en: "Molecular Sensors and Nanodevices. Principles, Designs and Applications in Biomedical Engineering". Elsevier (Oxford, UK), 1-42 (2014).

Artículos derivados de la Tesis
